

Funktionelle Charakterisierung
der Chaperon-assoziierten Ubiquitinligase CHIP
in *Drosophila melanogaster*

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Riga Tawo

aus Heidelberg

Bonn 2015

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Referent : Professor Dr. rer. nat. Jörg Höhfeld

Korreferent : Professor Dr. rer. nat. Albert Haas

Tag der Promotion: 29.01.2016

Erscheinungsjahr: 2016

Danksagung

Herrn Professor Dr. Jörg Höhfeld danke ich sehr für die Möglichkeit, diese Promotionsarbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können, und für das in mich gesetzte Vertrauen.

Herrn Professor Dr. Albert Haas danke ich sehr für die Übernahme des Korreferates.

Ganz besonders möchte ich meinen „Freunden von der Arbeit“ danken. Für ein tolles Arbeitsklima und eine sehr schöne gemeinsame Zeit. Ihr seid die Besten. Außerdem danke ich Dr. Gerrit Loch für die Hilfe bei wissenschaftlichen Fragen und die Bereitstellung von Materialien bezüglich *Drosophila melanogaster*.

Den Mitgliedern meines Instituts danke ich für die große Hilfsbereitschaft und die gute Atmosphäre während meiner Arbeit.

Zudem möchte ich von ganzem Herzen meinen Eltern und meinen Schwestern danken, dass sie immer für mich da gewesen sind und hoffentlich auch sein werden.

Publikationen und Kongressbeiträge

Arndt, V., Dick, N., **Tawo, R.**, Dreiseidler, M., Wenzel, D., Hesse, M., Fürst, D.O., Saftig, P., Saint, R., Fleischmann, B.K., Hoch, M., Höhfeld, J.(2010). Chaperone-assisted selective autophagy is essential for muscle maintenance. *Curr Biol* **20** (2), 1-6.

Kettern N., Dreiseidler M., **Tawo R.**, and Höhfeld J. (2010). „Chaperone assisted degradation: multiple paths to destruction.” *Biological chemistry* **391** (5), 481-489.

Poster und Vorträge:

Dick, N., **Tawo, R.**, Dreiseidler, M., Arndt, V., Höhfeld, J. (2010). Chaperone-assisted selective autophagy is essential for muscle proteostasis (Poster). 61. Mosbacher Kolloquium. The Biology of Aging: Mechanisms and Intervention, Mosbach

Tawo R. (2011). Chaperone-assisted selective autophagy is essential for muscle maintenance (Vortrag). Annual Symposium of SFB 635, Wermelskirchen, Köln.

Tawo, R., Dick, N., Arndt, V., Höhfeld, J. (2011). Chaperone-assisted selective autophagy is essential for muscle maintenance (Poster). SFB 635 Begutachtung, Köln

1	ZUSAMMENFASSUNG	5
2	EINLEITUNG	7
2.1	Molekulare Chaperone der Hsp70-Proteinfamilie	7
2.2	Chaperon-vermittelter proteasomaler Abbau (CAP)	9
2.2.1	Das Ubiquitin-Proteasom-System	9
2.3	Die Chaperon-assoziierte Ubiquitinligase CHIP	12
2.4	CHIP-Funktion bei der Clathrin-vermittelten Endozytose	14
2.5	Der Insulin Signalweg	17
2.6	Der Prozess des Alterns	19
3	MATERIAL	21
3.1	Allgemeine Materialien	21
3.1.1	Geräte	21
3.1.2	Verbrauchsmaterialien	22
3.1.3	Kits, Enzyme und Standards	23
3.1.4	Chemikalien, Medien und Reagenzien	23
3.1.5	Inhibitoren	25
3.2	Antikörper	26
3.2.1	Primärantikörper	26
3.2.2	Sekundärantikörper	27
3.3	Primer (Oligonukleotide)	27
3.4	Plasmide	28
3.5	siRNA	29
4	METHODEN	30
4.1	Methoden im Umgang mit <i>Escherichia coli</i>	30
4.1.1	Kultivierung von Bakterien	30
4.1.2	Transformation chemisch kompetenter <i>E.coli</i> Zellen	31
4.1.3	Expression rekombinanter Proteine in <i>E.coli</i>	31

4.1.4	Bakterienstämme	32
4.2	Methoden im Umgang mit eukaryontischen Zellen	32
4.2.1	Kultivierung von Säugerzellen	32
4.2.2	Transfektion mit Calciumphosphat	33
4.2.3	Liposomen-vermittelte Transfektion	34
4.3	Methoden im Umgang mit <i>Drosophila melanogaster</i>	35
4.3.1	Fliegenfutter	35
4.3.2	Apfelsaftagarplatten	35
4.3.3	Fliegenlinien	35
4.3.4	Fliegenhaltung	36
4.3.5	Ektopische Expression mittels des UAS-GAL4 Systems	36
4.3.6	Ektopische Expression mit Hilfe des „Geneswitch“ Systems	37
4.4	Molekularbiologische Methoden	37
4.4.1	DNA-Plasmidisolierung im kleinen Maßstab (Minipräparation)	37
4.4.2	DNA-Plasmidisolierung im grossen Maßstab (Maxi-präparation)	38
4.4.3	RNA Präparation aus Säugerzellen	38
4.4.4	RNA Präparation aus adulten Fliegen	39
4.4.5	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	39
4.4.6	Enzymatischer Verdau von DNA durch Endonukleasen	39
4.4.7	Elektrophorese im Agarosegel zur Trennung von DNA nach Länge	40
4.4.8	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	41
4.4.9	Ligation von DNA	41
4.4.10	DNA-Sequenzanalyse	41
4.4.11	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifizierung von DNA	41
4.4.12	Quantitative Real-Time PCR (qPCR)	43
4.5	Proteinbiochemische Methoden	46
4.5.1	Herstellung von Proteinextrakten aus E.coli	46
4.5.2	Herstellung von Proteinextrakten aus Säugerzellen	47
4.5.3	Herstellung von Proteinextrakten aus adulten Fliegen	47
4.5.4	Bestimmung der Proteinkonzentration	48
4.5.5	Proteinfällung	48
4.5.6	SDS–Polyacrylamid–Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	49
4.5.7	Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen	51
4.5.8	Kolloidale Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen	51
4.5.9	Transfer von Proteinen auf eine Nitrocellulose-Membran (Western Blot, Nass-Blot-Verfahren)	52
4.5.10	Immundetektion („Western-Blot“)	52
4.5.11	Aufreinigung von Histidin-Fusionsproteinen in <i>E. coli</i>	53

4.5.12	Aufreinigung von MBP-Fusionsproteinen in <i>E. coli</i>	54
4.5.13	<i>in-vitro</i> -Ubiquitinierung	55
5	STATISTIK	57
5.1	Überlebensexperimente	57
6	ERGEBNISSE	59
6.1	Analyse des CHIP Proteins (DCHIP) in <i>Drosophila melanogaster</i>	59
6.1.1	Das <i>Drosophila</i> Ortholog DCHIP	59
6.1.2	Expressionsanalyse des DCHIP Proteins in adulten <i>Drosophila melanogaster</i>	60
6.1.3	Ubiquitäre Depletion von DCHIP	61
6.1.4	Muskelspezifische Depletion von DCHIP	62
6.1.5	DCHIP-Depletion im zentralen Nervensystem	63
6.1.6	DCHIP-Depletion im Fettkörper und Mitteldarm	65
6.2	Proteinbiochemische Analyse der CHIP-Funktion in Säugerzellen	67
6.2.1	CHIP vermittelt den Abbau von phosphoryliertem AKT	67
6.2.2	Depletion von CHIP führt zur verstärkten Aktivierung des Insulin Signalwegs	68
6.2.3	Depletion von CHIP führt zur Stabilisierung des Insulinrezeptors	68
6.2.4	CHIP stimuliert den Abbau des Insulinrezeptors	69
6.2.5	CHIP assoziiert mit dem Insulinrezeptor <i>in-vivo</i>	70
6.2.6	Identifikation der CHIP- und Hsc70-Bindemotive im Insulinrezeptor	71
6.2.7	CHIP ubiquitiniert den INSR <i>in-vitro</i>	73
6.2.8	Identifikation der ubiquitinierten Lysinreste im INSR mittels Massenspektrometrie	74
6.2.9	Bioinformatische Analyse zeigt Lysin K1047 liegt in unmittelbarer Nähe der CHIP- und Hsc70-Bindestellen im INSR	74
6.2.10	Der INSR wird <i>in-vivo</i> monoubiquitiniert	75
6.2.11	Der INSR wird über einen lysosomalen Weg abgebaut	76
6.2.12	Der INSR wird nicht über Autophagie abgebaut	78
6.2.13	CHIP vermittelt den Abbau des INSR über Endozytose	79
6.2.14	Lysin K1047 ist essentiell für den Abbau des INSR	79
6.2.15	CHIP-vermittelter INSR-Abbau ist Insulin unabhängig	80
6.2.16	CHIP-Expression verhindert Paraquat-induzierte INSR Akkumulation	81
6.2.17	DCHIP-Depletion in adulten Fliegen führt zur Akkumulation von oxidativ-geschädigten Proteinen	82
6.2.18	DCHIP-Depletion in adulten Fliegen führt zur Akkumulation des dInR	83

7	DISKUSSION	85
7.1	CHIP als molekulares Bindeglied zwischen Proteostase und Alterung	85
7.2	CHIP beeinflusst das Altern durch Regulation des IIS	90
8	VERZEICHNISSE	96
8.1	Literaturverzeichnis	96
8.2	Internetverweise	116
8.3	Abkürzungsverzeichnis	117

1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte die Chaperon-assoziierte Ubiquitinligase CHIP als zentrales Bindeglied zwischen Proteinhomöostase („Proteostase“) und Alterung identifiziert werden. Neben seiner Rolle als Proteinqualitätskontrollkomponente, die den Abbau fehlgefalteter Proteine induziert, konnte hier erstmals eine essentielle Funktion bei dem Abbau des Insulinrezeptors (INSR) nachgewiesen werden. Die ubiquitäre Depletion von CHIP in *Drosophila melanogaster* (DCHIP) führte zu einer dramatischen Reduktion der Lebensspanne der Tiere. Aufgrund der bereits beschriebenen CHIP Funktionen bei dem Erhalt der Muskelfunktion und dem Abbau aggregationsanfälliger Proteinspezies des zentralen Nervensystems, wurde DCHIP in diesen Geweben intensiver untersucht. Erstaunlicherweise führte weder eine Depletion von DCHIP in der Muskulatur noch im zentralen Nervensystem zu einer verkürzten Lebensspanne. In weiterführenden Analysen konnte der Mitteldarm als das Gewebe identifiziert werden, das auf eine DCHIP Funktion während der Alterung angewiesen ist. Eine Depletion von DCHIP ausschließlich in diesem Gewebe war für die Kurzlebigkeit der Fliegen ausreichend. Dies lässt vermuten, dass eine gewebespezifische Redundanz auf Ebene der E3-Ligase existiert und dass der Mitteldarm eine Sonderstellung hinsichtlich der DCHIP-vermittelten Regulation der Proteostase und der Alterung einnimmt.

Biochemische Analysen zeigten eine direkte Assoziation von CHIP und dem INSR. Dabei unterscheidet sich die Art der Bindung von CHIP an den INSR von den bereits beschriebenen CHIP-Substratproteinen, da sie auf keiner typischen hydrophoben Aminosäureabfolge basiert. Es konnte gezeigt werden, dass CHIP direkt an den INSR bindet, diesen monoubiquitiniert und dessen Abbau durch Endozytose vermittelt. Der Verlust von CHIP führte zu einer verstärkten Aktivierung des Insulin Signalwegs (IIS), gemessen an aktivierten Komponenten der Signalkaskade wie der AKT-Kinase. In gealterten Fliegen konnte aufgrund des Verlustes der DCHIP Funktion ebenfalls eine Stabilisierung des *Drosophila* Insulinrezeptors (dInR) sowie eine verstärkte Akkumulation fehlgefalteter Proteine beobachtet werden. Die durch oxidativen Stress induzierte Stabilisierung des INSR konnte durch gleichzeitige Expression von CHIP verhindert werden. Dies lässt nun folgenden Schluss zu: während der Alterung kommt es vermehrt zur Akkumulation oxidativ-geschädigter Proteine aufgrund zellulärer Prozesse wie der Atmungskette und des Stoffwechsels. Um eine Aggregation fehlgefalteter zytotoxischer Proteinspezies zu

verhindern, wird CHIP verstärkt für den Abbau dieser benötigt und kann nun den INSR nicht mehr effizient umsetzen. Dies führt zur einer indirekten Verstärkung des IIS und somit zu einer Inhibition überlebenswichtiger Faktoren, die für den Prozess des Alterns essentiell sind und die letztlich die Dauer der Lebensspanne bestimmen. Die vorliegende Arbeit etabliert somit die Ubiquitinligase CHIP als molekulares Bindeglied zwischen Proteostase und der Alterung durch die Regulation des Insulinrezeptors und des Insulin Signalwegs.

2 Einleitung

Proteine sind die molekularen Werkzeuge der Zelle und als solche erfüllen sie eine Vielzahl biologischer Funktionen, zum Beispiel als Strukturproteine, Enzyme im Metabolismus oder als Regulatoren der Genexpression und der Signaltransduktion. Die Funktion eines Proteins ist abhängig von der richtigen Faltung. Dabei bestimmt die Abfolge der Aminosäuren, die durch den „genetischen Code“ auf der DNA vorgegeben ist, letztlich die Tertiärstruktur des Proteins. Proteine exponieren häufig im Zuge der Neusynthese und zellulärer Prozesse wie der Signaltransduktion hydrophobe Bereiche, die normalerweise im Inneren der Tertiärstruktur des Proteins abgeschirmt sind. Diese hydrophoben Bereiche führen dazu, dass Proteine miteinander in Wechselwirkung treten und aggregieren. Diese Aggregate stehen in Verdacht zytotoxisch zu sein und zu Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson oder Huntington zu führen (Taylor et al., 2002). Um Aggregation von zytotoxischen Proteinspezies zu verhindern, werden Proteine bei der Synthese und bei Prozessen, die eine Konformationsveränderung des Proteins erfordern, von sogenannten Chaperonen gebunden. Chaperone binden die transient präsentierten, hydrophoben Bereiche und schirmen diese vor dem wässrigen zytoplasmatischen Milieu ab um eine Aggregation zu verhindern. Ist ein Protein irreversibel beschädigt und kann nicht über den Chaperon-Komplex rückgefaltet werden, muss es dem Proteinabbau zugeführt werden um die Integrität der Zelle zu gewährleisten (Höhfeld et al., 2001).

2.1 Molekulare Chaperone der Hsp70-Proteinfamilie

Eine zentrale Rolle im Chaperonnetzwerk spielen die molekularen Chaperone der Hsc-/Hsp70-Proteinfamilie („70 kDa heat shock protein“). Chaperone dieser Proteinklasse sind durch alle Spezies hinweg hoch konserviert, angefangen vom Bakterium bis hin zum Menschen. Dabei assistieren sie unter anderem bei zellulären Vorgängen, wie der Faltung neusynthetisierter oder entfalteter Proteine, der Signaltransduktion oder dem Proteinabbau (Mayer und Bukau, 2005).

Im Menschen sind acht Isoformen von Hsp70-Proteinen bekannt, wobei der Großteil im Zytoplasma lokalisiert ist. Nur jeweils eine Hsp70-Isoform wird im endoplasmatischen Retikulum und in Mitochondrien exprimiert (Daugaard et al., 2007). Die wohl charakteristischsten Mitglieder

der Hsp70-Familie sind das konstitutiv aktive Hsc70 („70 kDa heat shock cognate“) und das stressinduzierte Hsp70. Beide Proteine bestehen aus einer N-terminalen ATPase-Domäne, der in der Mitte gelegenen Peptidbindedomäne und der C-terminalen Deckel-Domäne (Mayer und Bukau, 2005). Die Hydrolyse des an der ATPase-Domäne gebundenen ATP's zu ADP verursacht eine Konformationsveränderung, die sich auf die beiden anderen Domänen auswirkt. Die Peptidbindedomäne besteht überwiegend aus β -Faltblättern und ermöglicht eine Bindung des Substratproteins an fünf aufeinanderfolgende Aminosäuren. Die aus alpha-Helices bestehende Deckeldomäne klappt um und fixiert das Substrat an das Chaperon. Dadurch maskiert das Chaperon die hydrophoben Bereiche des Substratproteins und verhindert somit eine Fehlfaltung oder Aggregation. Aufgrund der starken Homologie dieser beiden Proteine sowohl auf Sequenz- als auch auf Funktionsebene, werden diese fortan unter Hsp70 zusammengefasst.

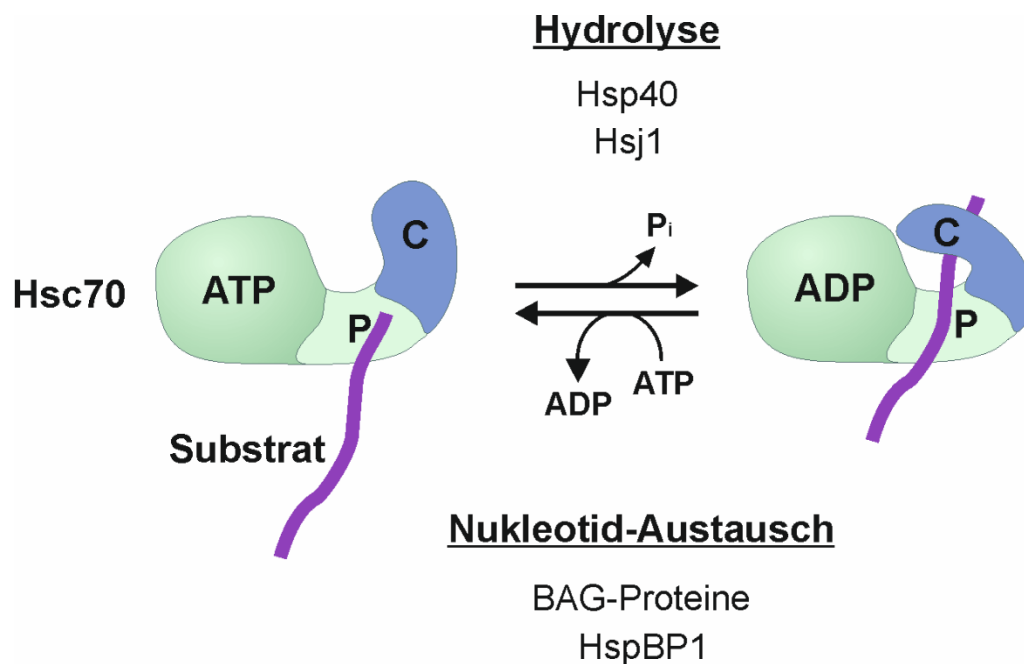


Abbildung 2.1: ATPase-Zyklus von Hsc70. Im ATP-gebundenen Zustand ist die C-terminale Deckeldomäne (C) geöffnet und das Substrat kann abwechselnd an die Peptidbindedomäne (P) gebunden und wieder freigelassen werden. Dabei ist die Affinität von Hsp70 zum Substrat gering. Durch die Hsp40-Proteine vermittelte Hydrolyse von ATP zu ADP schliesst sich die Deckeldomäne und die Affinität von Hsp70 zum gebundenen Substrat ist um ein Vielfaches höher. Das Substrat kann nicht vom Chaperon dissoziieren. Durch Nukleotid-Austausch-Faktoren wie den BAG-Proteinen oder HspBP1 erfolgt der Austausch von ADP zu ATP und das Substrat kann wieder freigelassen werden. Die Hsp70-regulierenden Proteine werden Cochaperone genannt und sie bestimmen unter anderem die Geschwindigkeit des ATPase-Zyklus von Hsp70.

Die Hydrolyse von ATP an Hsp70 wird durch ATPase aktivierende Cochaperone wie Hsp40, Hsj1 oder andere J-Domänen Proteine vermittelt (Laufen et al., 1999). Dabei besitzen diese selbst

Chaperonaktivität und binden hydrophobe Bereiche der Substratproteine. Anschließend erfolgt die Übergabe des Substrates an Hsp70. Der Austausch von ADP zu ATP wird von sogenannten Nukleotidaustauschfaktoren stimuliert, darunter befinden sich Cochaperone wie HspBP1 und die BAG-Domänen Proteine (Brehmer et al., 2001; Sonderrman, 2001; Shomura et al., 2005). Durch den Austausch von ADP zu ATP wird das Substrat nun wieder freigesetzt. Aufgrund der alternierenden ATP-abhängigen Bindung und Dissoziation des Substrates wird von einem ATPase-Zyklus gesprochen. Die mit Hsp70 assoziierten Cochaperone haben jedoch nicht nur eine regulatorische Funktion, sondern sie können Hsp70 an bestimmte subzelluläre Bereiche in Proteinkomplexe rekrutieren. Zudem ist ebenfalls eine Gewebespezifität einiger Cochaperone beschrieben.

2.2 Chaperon-vermittelter proteasomaler Abbau (CAP)

2.2.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System

Hsp70-Chaperone sind nicht nur an der Faltung von Substratproteinen beteiligt, sondern sie sind auch für deren Abbau verantwortlich. Kann ein Substrat im Zuge der Proteinsynthese oder anderer zellulärer Prozesse nicht korrekt gefaltet oder rückgefaltet werden, muss dieses abgebaut werden. Dadurch verhindert die Zelle die Akkumulation von zytotoxischen Proteinaggregaten und erhält somit ihre Integrität. Die Chaperone kooperieren dabei mit dem Ubiquitin-Proteasom-System (UPS). Das Substrat wird zunächst mit einer Ubiquitinkette versehen und anschließend durch das 26S-Proteasom abgebaut (Hartmann-Petersen et al., 2003; Finley et al., 2004; Varshavsky 2005). Die kovalente Konjugation des Abbaumarkers Ubiquitin, einem 76 Aminosäuren langen Protein, erfolgt in drei aufeinanderfolgenden Schritten. Zunächst wird Ubiquitin unter ATP-Verbrauch zu einem energiereichen Thiolesterintermediat durch ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym, dem E1-Enzym, aktiviert. Dabei entsteht eine Bindung über das C-terminal gelegene Glycin des Ubiquitin Moleküls mit einem Cysteinrest des E1-Enzyms. Das aktivierte Ubiquitin wird anschließend an ein Cysteinrest innerhalb des aktiven Zentrums eines Ubiquitin-konjugierenden Enzyms (E2) übertragen. Im letzten Schritt wird eine Ubiquitinligase (E3) rekrutiert und es erfolgt die Übergabe des Ubiquitins an das Substrat. Dabei unterscheidet man 2 Klassen von E3-Enzymen. (1) die **HECT-Domänen-Ligasen**, die das Ubiquitin selbst kovalent binden und es anschließend an das Substrat übertragen, und (2) die **RING-Finger-Ligasen**, die das Ubiquitin selbst nicht

binden, sondern nur die sterische Nähe des E2-Ubiquitin-Konjugats mit dem spezifischen Substrat vermitteln und somit die Übertragung des Ubiquitins an das Substrat begünstigen (Metzger, 2012). Zusätzliche Ubiquitineinheiten können nachfolgend an konservierte Lysinreste (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63) des bereits konjugierten Ubiquitins angeheftet werden (Kravtsova-Ivantsiv und Chiehanover, 2012). Die Verknüpfungsweisen der Polyubiquitinketten ergeben Kettenarchitekturen unterschiedlichster struktureller Eigenschaften. Die K48-verknüpfte Ubiquitinkette konnte als Abbausignal des proteasomalen Abbaus verifiziert werden (Thrower et al., 2000). Zudem konnten K63-Ketten verstärkt dem lysosomalen Abbau zugewiesen werden (Dammer et al., 2011). Einige Substrate benötigen zusätzlich zur Verlängerung der Ubiquitinkette ein E4-Enzym (Koegl et al., 1999). Bei der Ubiquitinierung handelt es sich um einen reversiblen Prozess. Dies hat den Vorteil, dass Ubiquitinmoleküle wiederverwendet werden können. Die Verkürzung der Ubiquitinkette wird durch so genannte deubiquitinierenden Enzyme („*deubiquitinating enzymes* (DUBs)“) vermittelt (Amerik und Hochstrasser, 2004). Diese Enzymklasse schneidet Ubiquitinmoleküle wieder von der Ubiquitinkette ab. Dabei haben sie nicht nur reine Recycling-Funktion, sondern sie agieren substratspezifisch und erhöhen somit die Spezifität der Ubiquitinierungsreaktion. Zudem können sie die Stabilität ihrer Substrate beeinflussen. Als Beispiel wäre hier das deubiquitinierende Enzym USP7 zu nennen, dass in Anwesenheit der p53-spezifischen Ligase MDM2 die Ubiquitinkette von p53 wieder abschneidet und somit die Stabilität von p53 erhöht. Zudem konnte gezeigt werden, dass USP7 die monoubiquitinierte Form von PTEN, welche aufgrund der Monoubiquitinierung im Zellkern lokalisiert ist, deubiquitiniert und dass dies anschließend zur Relokalisierung von PTEN in das Zytoplasma und zum proteasomalen Abbau führt (Satija, 2013). Der Abbau des ubiquitinierten Proteins erfolgt abschließend durch das 26S-Proteasom, einem 2,5 Megadalton großen zylindrischen Multiproteinkomplex, der aus einem 20S Kernkomplex mit proteolytischer Aktivität und zwei 19S Kappenkomplexen besteht (Baumeister et al., 1998; Pickart und Cohen, 2004). Die Ubiquitin-bindenden Proteine und die ATPasen der 19S-Untereinheit vermitteln die Erkennung der Ubiquitinkette und den Transfer des Substrates in das Innere der proteolytischen 20S-Untereinheit. Vorher wird jedoch die Ubiquitinkette durch Ubiquitinhydrolasen abgespalten und die Ubiquitinmoleküle ins Zytoplasma zur Wiederverwertung geschleust (Voges et al., 1999). Das Substrat wird nun in der 20S-Untereinheit in kleine Peptide hydrolysiert, die ebenfalls in Form von einzelnen Aminosäuren wiederverwertet werden können (Nandi et al., 2006).

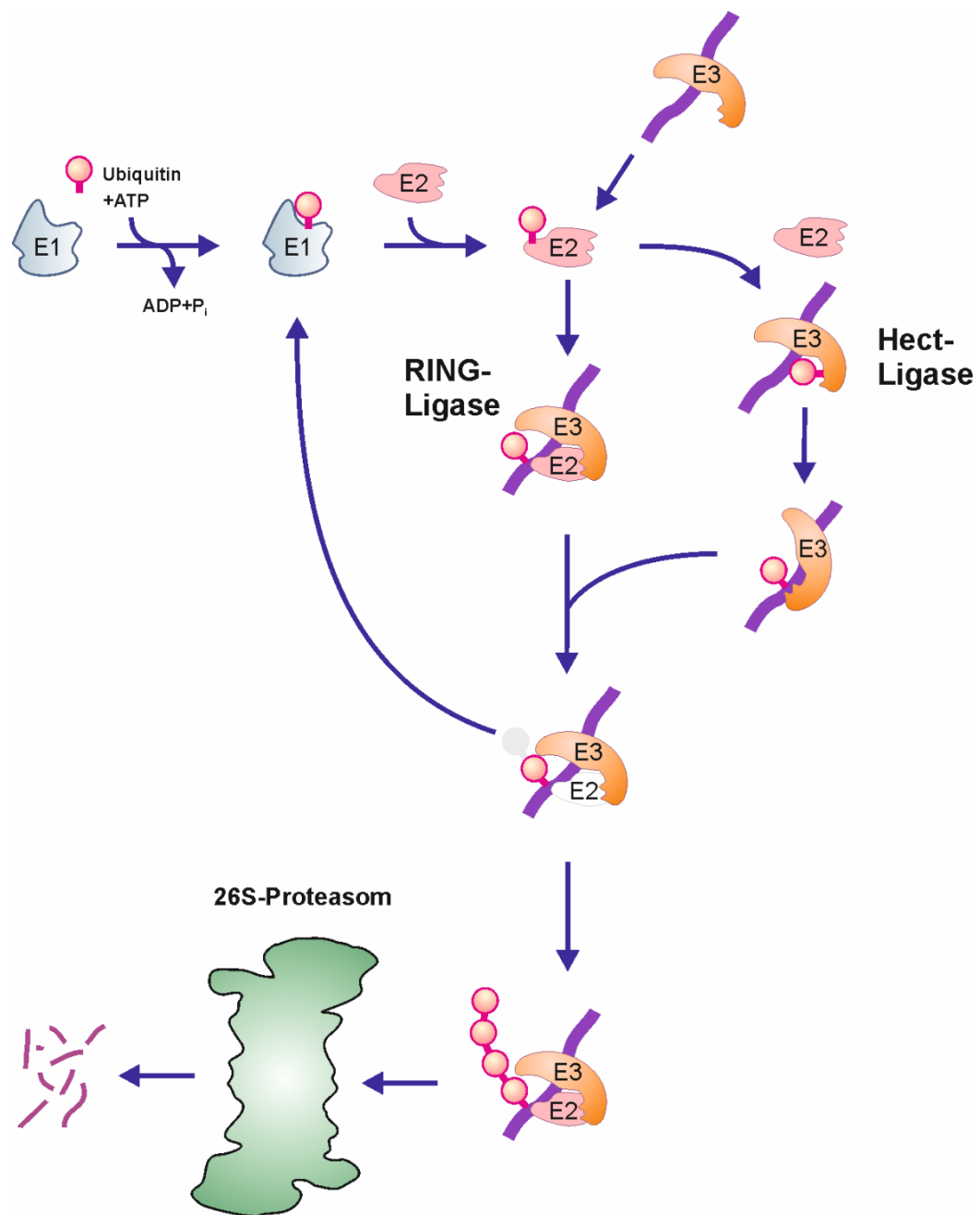


Abbildung 2.2: Das Ubiquitin-Proteasom-System. Die Markierung zum proteasomalen Abbau erfolgt über eine Polyubiquitinkette. Zunächst wird das E1-Enzym aktiviert, anschließend erfolgt die Konjugation des Ubiquitins auf das E2-Enzym. In Kooperation mit einer E3-Ligase, welche für die Substraterkennung zuständig ist, erfolgt die Übertragung des Ubiquitins auf das Substratprotein. Die Klasse der HECT-Domänen-Ligasen binden dabei zunächst das Ubiquitin kovalent selbst, bevor sie es auf das Substrat transferieren, während die RING-Finger-Ligasen lediglich die sterische Nähe des E2's zum Substrat herstellen. Durch Wiederholung dieses Zyklus entsteht eine Polyubiquitinkette, die das Substrat zum 26S-Proteasom rekrutiert, in dessen Inneren es anschließend in kleine Peptide gespalten wird.

2.3 Die Chaperon-assoziierte Ubiquitinligase CHIP

Die Substraterkennung muss nicht direkt durch eine Ubiquitinligase erfolgen, sondern kann im Zuge der Proteostaseregulation durch ein Chaperon vermittelt werden. Molekulare Chaperone wie das Hsc70 binden entfaltete Proteine und versuchen diese rückzufalten und an Hsp90, ein weiteres Chaperon, zu übergeben. Ist dies nicht möglich, bindet CHIP („*C-Terminus of Hsc70-interacting protein*“) an Hsc70, vermindert dadurch die Faltungsaktivität des Chaperons und ubiquitiniert das Substrat (Ballinger et al., 1999; Connell et al., 2001). CHIP wurde ursprünglich als TPR („*tetratricopeptide repeat*“-)Domänen Protein isoliert (Ballinger et al., 1999). TPR-Motive kommen in einer Vielzahl von Cochaperonen vor (Frydman und Höfeld, 1997; Scheufler et al., 2000; Young et al., 2003), sie bestehen aus mehreren Wiederholungen einer 34 Aminosäuren langen Sequenz und bilden mit einer stark geladenen Alpha-Helix die Bindestelle für Hsc70 und Hsp90 (Ballinger et al., 1999; Connell et al., 2001). Die C-terminal gelegene U-Box Domäne ist strukturell verwandt mit der Ring-Domäne der Ring-Finger-Ligasen (Jackson et al., 2000; Joazeiro und Weisman, 2000) und vermittelt die Interaktion mit dem Ubiquitin-konjugierenden E2-Enzym der UbcH5-Proteinfamilie (Demand et al., 2001; Jiang et al., 2001; Murata et al., 2001; Hatakeyama et al., 2001). Die U-Box Domäne ist demnach essentiell für die Ubiquitinligasefunktion von CHIP (Hatakeyama et al., 2001; Jiang et al., 2001). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Dimerisierung von CHIP, vermittelt durch die *coiled-coil*-Domäne, ebenfalls notwendig für die Ubiquitinligasefunktion ist (Nikolay et al., 2004). CHIP scheint allerdings auch Hsc70 unabhängig Substrate binden und ubiquitinieren zu können und spielt somit auch eine Rolle bei der direkten Erkennung des Substrates (Demand et al., 2001). Chaperonsubstrate, die CHIP-abhängig ubiquitiniert und abgebaut werden, lassen sich in 2 Gruppen unterteilen:

(1) Proteine, die einer Chaperon-assistierten konformationellen Regulation unterliegen, wie zum Beispiel Hormonrezeptoren (erbB2), Transkriptionsfaktoren (Tumorsuppressor p53) und Kinasen der Signaltransduktion (Raf1-Kinase) (Connell et al., 2001; Demand et al., 2001; Esser et al., 2005; Xu et al., 2002). In ihrem inaktiven Zustand ist die Struktur dieser Proteine instabil und sie exponieren Bereiche, die vom Chaperon erkannt und gebunden werden. In Anwesenheit eines aktivierenden Signals, werden diese Proteine in die stabile aktive Form gefaltet und können ihrer Funktion nachgehen. Bleibt das Signal jedoch aus, werden diese Chaperon-gebundenen Proteine von CHIP zum Abbau markiert.

(2) Aggregationsanfällige Proteine, die im Zuge der Proteinqualitätskontrolle von Chaperonen erkannt und abgebaut werden, wie zum Beispiel die unreife Form des CFTR („*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*“), hyperphosphoryliertes Tau, α -Synuclein und Polyglutamin-enthaltendes Huntingtin (Meacham et al., 2001; Shin, 2005; Dickey et al., 2007).

A



B

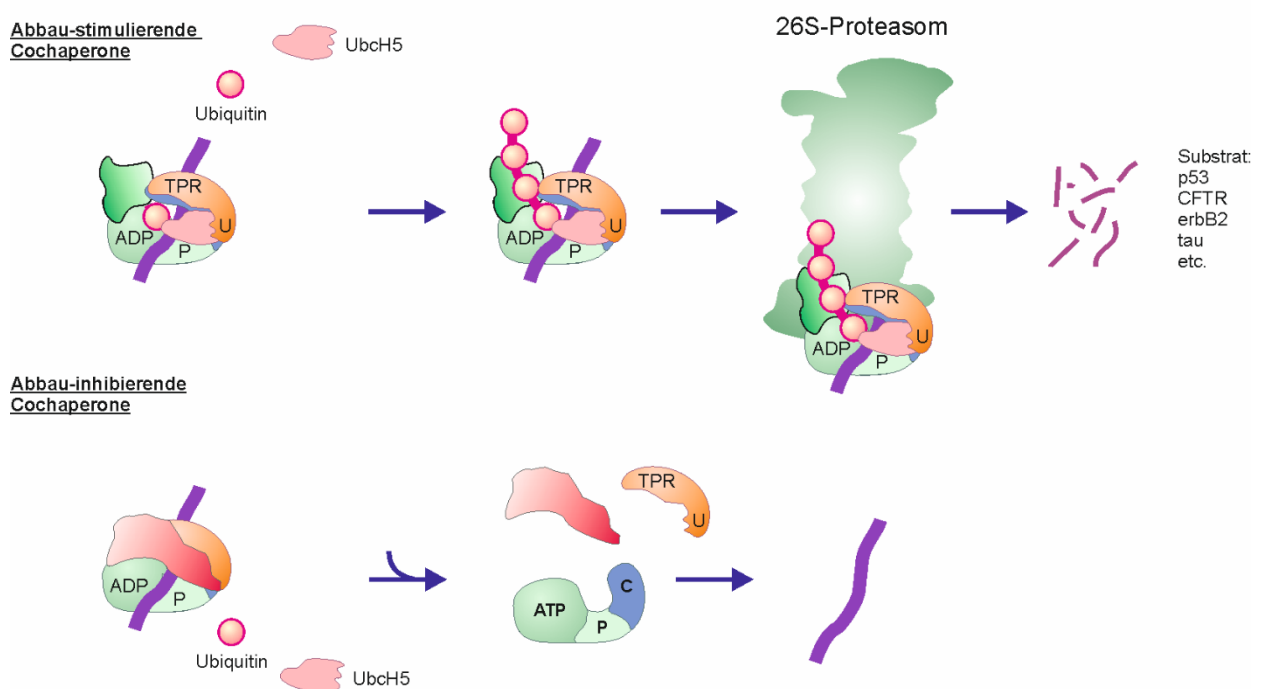


Abbildung 2.3: Mechanismen des CHIP-vermittelten proteasomalen Abbaus (CAP). **A** Schematische Darstellung der Domänenstruktur des humanen CHIP Proteins. **B.** Chaperon-vermittelter proteasomaler Abbau (CAP). Hsc70 bindet das entfaltete Substrat und rekrutiert CHIP und UbcH5 in den Abbaukomplex. Das gebundene Substrat wird nun von CHIP mit einer Polyubiquitinkette versehen, welches als Abbausignal gilt, und anschließend im 26S-Proteasom abgebaut. **C.** Der CHIP-Hsc70 Abbaukomplex wird durch Cochaperone reguliert. Dabei unterscheidet man die Abbau-stimulierenden von den Abbau-inhibierenden Cochaperonen. Die Abbau-stimulierenden Cochaperone können zum einen die Affinität von Hsc70 zum Substrat verstärken als auch die ATPase-Aktivität von Hsc70 erhöhen. Die Abbau-inhibierenden Cochaperone verhindern die Bindung von UbcH5 an Hsc70-CHIP oder aber verhindern durch sterische Inhibition die Ubiquitinierung des Substrates.

Dies verdeutlicht die zentrale Rolle von CHIP bei der Proteinqualitätskontrolle und bei der Entstehung von Krankheiten wie Mukoviszidose, Alzheimer, Parkinson und Huntington. Beim Abbau von Chaperonsubstraten kooperiert der CHIP-Chaperon-Komplex mit diversen

regulatorischen Cochaperonen. So konnte das Cochaperon HSP1 („*DnaJ* (Hsp40) *homolog, subfamily B, member 2*“) als Eskortfaktor für Substrate beim proteasomalen Sortierungsprozess identifiziert werden, in dem es die ATP-Hydrolyse und somit die Affinität des Chaperons zum Substrat erhöht (Westhoff et al., 2005). Cochaperone wie BAG-1 vermitteln zusätzlich über eine Ubiquitin-ähnliche Domäne („Ubl= *ubiquitin like domain*“) die Assoziierung des Substrats an das 26S-Proteasom (Alberti et al., 2002). Neben Abbau-stimulierenden gibt es auch Abbau-inhibierende Cochaperone wie BAG-2 und HspBP1. BAG-2 bindet kompetitiv an die ATPase-Domäne von Hsc70 und verhindert durch sterische Inhibition die Bindung des E2-Enzyms an den CHIP-Chaperon-Komplex. Dadurch kann das Substrat nicht mehr von CHIP ubiquitiniert und abgebaut werden (Arndt et al., 2005). HspBP1 agiert auf ähnliche Weise und inhibiert die Ubiquitinierung des Substrates, verhindert jedoch nicht die Assoziation des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms an den Komplex (Alberti et al., 2004). Ist ein Proteinsubstrat durch CHIP ubiquitiniert worden, erfolgt meist der Abbau im 26S-Proteasom. Alternativ zum Proteasom kann der Abbau von CHIP-Substraten auch über lysosomale Abbauege erfolgen. Bei der Chaperon-assistierten selektiven Autophagie (CASA) zum Beispiel wird das Muskelprotein Filamin CHIP-abhängig ubiquitiniert und dem autophagischen Abbau zugeführt (Arndt et al., 2010). Muskeln sind aufgrund von Kontraktionen permanent mechanischem und oxidativem Stress ausgesetzt. Dabei kommt es in der Folge zur Abnutzung des unter Spannung-stehenden Gerüstproteins Filamin bis hin zur Denaturierung und Aggregation. Hsc70 bindet Filamin und ubiquitiniert dieses im Zusammenspiel mit dem kleinen Hitzeschockprotein HspB8, dem Cochaperon BAG-3 und CHIP. Durch Rekrutierung des selektiven Ubiquitinadapters p62 wird nun das ubiquitinierte Filamin an LC3 gekoppelt und in ein Autophagosom eingeschnürt. Anschließend fusioniert das Autophagosom mit dem Lysosom und es erfolgt der Abbau durch lysosomale Hydrolasen. Somit bewahrt CHIP die Muskelintegrität und verhindert die Ausbildung einer Muskelerkrankung. Ein weiterer Abbaueg an dem CHIP beteiligt ist, ist die Clathrin-vermittelte Endozytose und soll im folgenden Kapitel näher betrachtet werden.

2.4 CHIP-Funktion bei der Clathrin-vermittelten Endozytose

Einen weiteren zellulären Abbaueg für Proteine stellt die Endozytose dar. Dabei werden Plasmamembran-ständige Proteine und Lipide in einem Vesikel von der Zelloberfläche abgeschnürt und das Vesikel, das sogenannte Endosom, wird nach und nach angesäuert bis es

letztlich mit dem Lysosom fusioniert. Es folgt der Abbau des Cargo-Proteins im Lysosom. Dadurch reguliert die Zelle die Plasmamembranzkomposition und ermöglicht es somit auf diverse extrazelluläre Signale unterschiedlich zu reagieren. Desweiteren dient sie der Aufnahme von Nährstoffen und Mineralien. Es sind eine Reihe endozytischer Prozesse bekannt, hier soll jedoch aus Relevanzgründen für diese Arbeit nur die Clathrin-vermittelte Endozytose beschrieben werden (Takei und Haucke, 2001; Rappoport, 2008; McMahon und Boucrot, 2011).

Clathrin ist ein Protein, welches für die Einstülpung der Membran notwendig ist. Es bildet ein Hexamer aus drei schweren und drei leichten Untereinheiten, von denen es je zwei Isoformen gibt. Die Untereinheiten sind in Form eines Dreibeins (Triskelion) angeordnet. Die strukturellen Eigenschaften ermöglichen Clathrin die Assemblierung in hexagonalen und pentagonalen Flächen, welches zur Ausbildung einer der Membran zugewandten konkaven Seite und einer der Membran abgewandten konvexen Seite führt. Dies begünstigt die Bildung der Vesikel, die daraufhin Dynamin-abhängig von der Plasmamembran abgeschnürt werden. Dynamine sind Proteine, die auf die mechanische Abschnürung von Vesikeln von Membranen spezialisiert sind. Mit Hilfe von Adapterproteinkomplexen (AP's), die direkt mit Clathrin interagieren, wird die Ladung („Cargo“) des Endosoms bestimmt. Nach der Abschnürung der Clathrin-beschichteten Vesikel folgt das sogenannte „uncoating“, welches zu einer Ablösung und Rückgewinnung der Clathrin-Moleküle führt. Die am besten untersuchte Klasse an Proteinen, die durch Clathrin-vermittelte Endozytose aufgenommen werden, stellen die Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK's) dar. Im Zuge der Signaltransduktion aktivieren extrazelluläre Signalstoffe, wie z.B. Hormone, die RTK's. Dies führt zu konformationellen Veränderungen der RTK's und aufgrund dieser Veränderungen präsentieren diese neue Binde-/Modifizierungsstellen für Kinasen, welche die Rezeptoren daraufhin phosphorylieren. Auf die Phosphorylierung folgt zu meist eine Monoubiquitinierung, welches als Signal zur Internalisierung des Rezeptors gilt (Haglund et al., 2003). Es folgt die Endosomenreifung bis hin zur Fusion mit dem Lysosom, in dem der Rezeptor abgebaut wird. Alternativ kann der Rezeptor aber auch wieder an die Plasmamembran recycelt werden. Dies spart der Zelle eine aufwendige Neusynthese des Rezeptors. Hsc70 konnte eine essentielle Rolle beim „uncoating“ der Clathrin-Hülle zugeschrieben werden. Dabei bindet Auxilin (*DNAJC6*), ein Hsp40-Protein, direkt an Clathrin, rekrutiert ATP-abhängig Hsc70 in den Komplex und stimuliert die ATPase-Aktivität von Hsc70. Dies führt zum Herauslösen Clathrins aus der Membran bis hin zum vollständigen „uncoating“ der Clathrin-Hülle aus der gebildeten Endosomenmembran (DeLuca-Flaherty et al., 1990; Ungewickell et al., 1995; Fotin et al., 2004). Dieser Schritt ist essentiell für die Endosomenreifung und die schlussendliche Fusion mit dem Lysosom. Der

Ubiquitinligase CHIP konnte eine Rolle bei der Clathrin-vermittelten Endozytose nachgewiesen werden, in dem es den Endozytose-Adapter Epsin ubiquitiniert (Timsit et al., 2005). Epsin selbst ist ein Ubiquitin-Adapterprotein, dass über seine 2 UIM-Domänen („*ubiquitin interacting motifs*“) ubiquitinierte Cargoproteine bindet und sie den Clathrin-beschichteten Vesikeln zuführt.

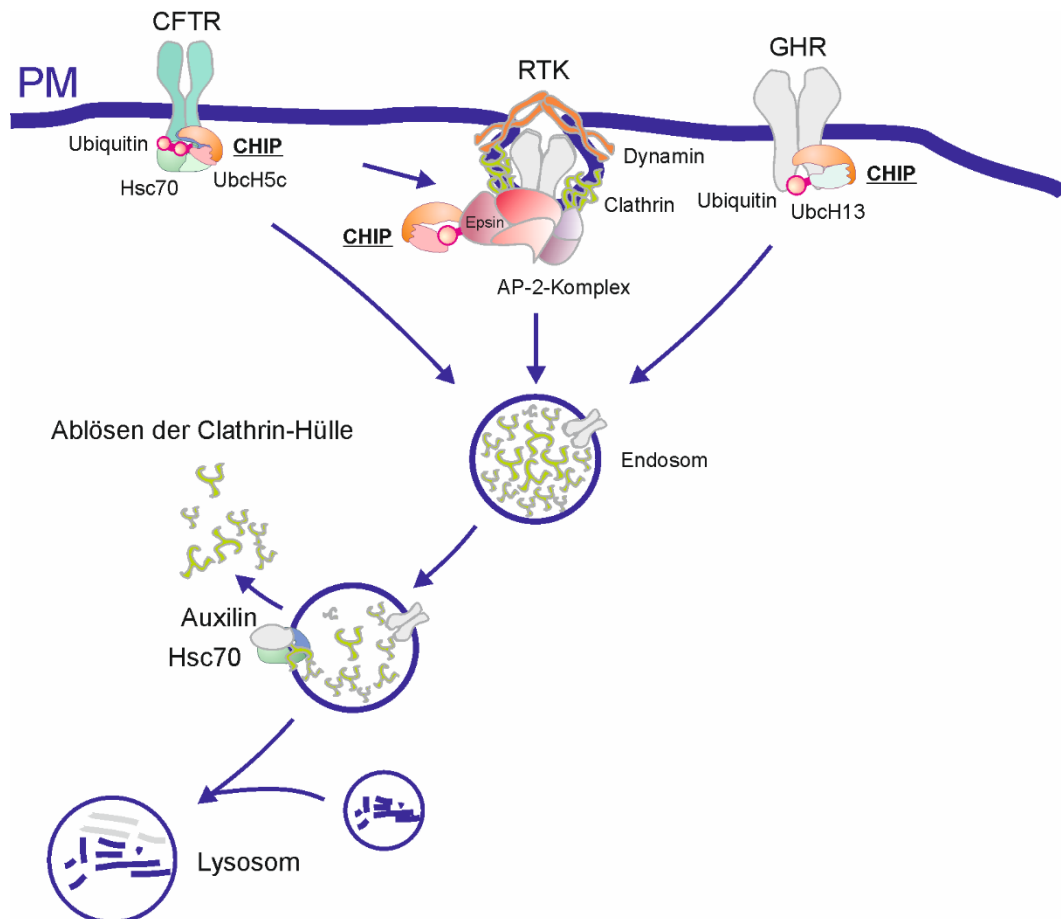


Abbildung 2.5: CHIP und Hsc70 Funktion bei der Clathrin-vermittelten Endozytose. Bei der Endozytose werden Membran-ständige Lipide und Proteine wie Rezeptortyrosinkinasen in Vesikeln von der Plasmamembran abgeschnürt und dem lysosomalen Abbau zugeführt. Bei der speziellen Form der Clathrin-vermittelten Endozytose bewirkt die Assemblierung von Clathrinmolekülen die Invagination der Membran und fördert somit die Abschnürung eines Vesikels von der Plasmamembran. Der letzte Schritt der Abschnürung wird durch die spiralförmige GTPase Dynamin bewerkstelligt, die sich um den Hals des abknospenden Vesikels legt und bei GTP-Hydrolyse den Hals und somit das Vesikel abschnürt. Die Spezifität des Cargos ist abhängig von Ubiquitinadapterproteinen die am AP2-Komplex assoziiert sind. Hsc70 konnte im Zusammenspiel mit Auxilin, einem DNAJ Protein, eine essentielle Funktion beim „uncoating“ der Clathrin-Hülle zugewiesen werden. CHIP ubiquitiniert im Komplex mit UbcH13 den GHR und markiert diesen zum Abbau durch Endozytose. CHIP fungiert jedoch nicht nur bei der Markierung von Substratproteinen, sondern monoubiquitiniert und aktiviert Epsin, ein Ubiquitinadapter, und ist somit essentiell für die Internalisierung und dem Voranschreiten des endozytischen Prozesses. Zudem konnte CHIP eine Funktion im Zuge der peripheren Proteinqualitätskontrolle nachgewiesen werden, denn CHIP vermittelt den Abbau einer konformationellen instabilen Form des CFTR, welche zunächst durch Hsc70 erkannt und gebunden wird. Durch Rekrutierung des E2-Enzyms UbcH5c und CHIP erfolgt die Ubiquitinierung und der anschließende Abbau des CFTR durch Endozytose.

Zudem fungiert Epsin als ein Kopplungsfaktor zwischen Eps15 und dem AP2-Komplex, einer Hauptkomponente der Clathrin-vermittelten Endozytosemaschinerie, und ist beim „Coating“ und bei der Abschnürung der Vesikel beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass dabei eine Monoubiquitinierung von Epsin essentiell ist (Oldham et al., 2002). Zudem konnte CHIP zusammen mit dem E2-Enzym Ubc13 eine Funktion bei der Endozytose des GHR („*Growth Hormone Receptor*“) nachgewiesen werden (Slotman et al., 2012). Im Zuge der peripheren Proteinqualitätskontrolle vermittelt CHIP außerdem den Abbau einer temperatursensitiven instabilen Form des CFTR („*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*“) an der Plasmamembran durch Endozytose (Okiyoneda et al., 2010). Dabei wird die Substraterkennung durch Hsc70 vermittelt und benötigt das E2-Enzym UbcH5c.

2.5 Der Insulin Signalweg

Der Insulin Signalweg (IIS) („*insulin and insulin-like growth factor 1 (IGF1) signalling*“) ist einer der konserviertesten und wichtigsten metabolischen Signalwege in höheren Organismen. Dabei fungiert der IIS als eine Art Sensor des Nährstoffangebots und ist für die Bewahrung der Energiehomöostase verantwortlich. Zum einen führt die Aktivierung des IIS zu Nährstoffaufnahme und Speicherung, zum anderen reguliert der IIS die bereits gespeicherten Nährstoffe und aktiviert diese bei Energiebedarf. Am besten untersucht ist dieses Phänomen anhand des Glukosestoffwechsels, bei dem ein streng reguliertes Gleichgewicht zwischen Glukosespeicherung (Glukoneogenese) und dem Glukoseabbau (Glykolyse) besteht (Taha und Klip, 1999; Chang, 2004). Ist diese Regulation gestört, kann es zu Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus oder der Insulinresistenz kommen. Weitere wichtige Funktionen erfüllt der IIS unter anderem beim Lipidstoffwechsel, beim Zellwachstum, bei der Zellproliferation, dem Erhalt der Proteostase sowie der Regulation der Lebensspanne (Straus et al., 1981; Saltiel und Kahn, 2001; Partridge et al., 2011; Chiang et al., 2012). Aktiviert wird der IIS durch die Bindung von Insulin oder Insulin-ähnlichen Hormonen an den Insulinrezeptor (INSR). Die hohe Konservierung des Insulin Signalwegs wird daran deutlich, dass selbst humanes Insulin in der Lage ist den *Drosophila* Insulinrezeptor (dInR) zu aktivieren (Brogiolo et al., 2001). Der INSR gehört zur Klasse der membranständigen Rezeptortyrosinkinasen und ist aus 2 α - und 2 β -Untereinheiten zu einem Hetero-Tetramer zusammengesetzt. Dabei müssen zunächst die unreifen Präproteine des INSR im ER prozessiert werden um funktional zu werden. Anschließend erfolgt die Translokation

über das Trans-Golgi Netzwerk an die Plasmamembran. Durch die Bindung von Insulin an den INSR erfolgt eine konformationelle Veränderung, die zur Annäherung der beiden zytoplasmatischen Domänen der β -Untereinheiten führt, die sich nun sowohl selbst als auch gegenseitig phosphorylieren. Man spricht dabei von einer trans-Autophosphorylierung. Der INSR aktiviert nun das Insulinrezeptor Substrat 1 (IRS-1), welches seinerseits die PI3-Kinase phosphoryliert. Der INSR kann jedoch auch direkt die PI3-Kinase aktivieren. Die PI3-Kinase phosphoryliert Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat, welches als Phospholipid ein Bestandteil der Plasmamembran ist, zu Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphat, welches seinerseits die Kinase AKT aktiviert. Die Serin-/Threonin-Kinase AKT spielt eine zentrale Rolle im Insulin Signalweg. Sie verhindert zum einen die Apoptose, den programmierten Zelltod, durch Inaktivierung des proapoptotischen Proteins BAX (Tsuruta et al., 2002; Gardai et al., 2004). AKT phosphoryliert und inaktiviert direkt den Transkriptionsfaktor FOXO („*forkhead box O*“), welcher zum einen die Expression von Stressproteinen induziert und zum anderen die Translation und somit die Zellproliferation inhibiert. Durch die Phosphorylierung durch AKT wird FOXO im Zytoplasma zurückgehalten, ubiquitiniert und proteasomal abgebaut. FOXO kann nun nicht mehr als „Proliferationsbremse“ fungieren (Miron et al., 2003; Puig et al., 2003; Zhang, 2011; Santo et al., 2013). Eine weitere wichtige Funktion von AKT ist die Aktivierung der Kinase mTOR („*mammalian target of rapamycin*“) durch Aktivierung der GTPase Rheb („*ras-homolog-enriched-in-brain*“). Rheb aktiviert mTOR, welches nun seinerseits die S6-Kinase („*ribosomal protein S6—p70-protein kinase*“) phosphoryliert.

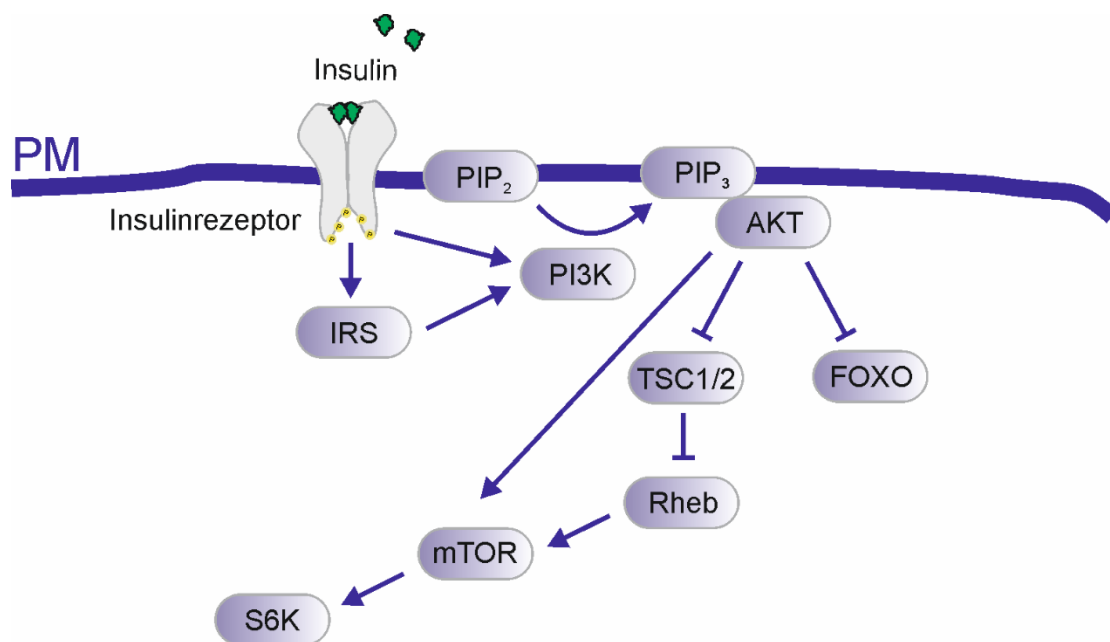


Abbildung 2.6: Der Insulin Signalweg (IIS). Schematische Darstellung der wichtigsten Komponenten des IIS bei aktivem Signalweg.

Die S6-Kinase stimuliert daraufhin die Initiation der Proteintranslation durch Aktivierung des ribosomalen Proteins 6. Diese Eigenschaften verdeutlichen den onkogenen Status von AKT. Die hier beschriebenen Proteine bilden nur das Grundgerüst des weitaus komplexeren Insulin Signalwegs und seiner Verknüpfungen mit anderen metabolischen Signalkaskaden. Bislang sind über 200 Proteine bekannt die aktiv am Insulin Signalweg beteiligt sind (Saltiel und Pessin, 2002; Hay und Sonenberg, 2004; Teleman, 2010).

2.6 Der Prozess des Alterns

Lebewesen haben eine höchst unterschiedliche Lebensspanne, die von einigen wenigen Minuten bis hin zu vielen Jahren liegen kann, abhängig von ihrer ökologischen Nische (Barzilai et al., 2012). Dabei ist jeder Organismus dem Altern unterworfen, einem Verschleiss- und Beschädigungsprozess der schlussendlich zum Tod führt. Bislang konnte keine einheitliche Theorie des Alterns gefunden werden, die diese evolutionär oder mechanistisch erklären könnte. Vielmehr handelt es sich beim Altern um einen systemischen Abnutzungsprozess aller Gewebe des Körpers. Man geht davon aus, dass es keine genetischen Programme für den Tod gibt, sondern dass eine Reihe von Mechanismen existieren, die letztlich in der Summe der schädlichen inneren sowie äusseren Einflüsse zur verminderten Lebensspanne führen. Innere Einflüsse sind z.B. somatische Mutationen oder zytotoxische Stoffwechselprodukte; bei äusseren Einflüssen handelt es sich um mechanische Verletzungen, Strahlung, pathogenen Mikroorganismen oder Nahrungsmangel (Kirkwood und Austad, 2000; Kirkwood, 2005). Dabei erklärt das gängigste Alterungsmodell, die „*Disposable Soma Theory*“ den Zusammenhang zwischen der energetischen Investition in den Erhalt und Schutz des Somas, welches zu einer Lebensverlängerung führt, gegenüber dem energetischen Aufwand der für Wachstum und Reproduktion nötig ist, welches den gegenteiligen Effekt hat (Kirkwood, 1977). Im Zusammenhang mit dem Prozess des Alterns konnten einige hoch konservierte Signalwege identifiziert werden, die eine Rolle bei der Immunabwehr, Gewebereparatur, Stressresistenz und der Energiehomöostase spielen, so wie unter anderem der bereits erwähnte Insulin Signalweg (Barzilai et al., 2012; Giannakou und Partridge, 2007; Vijg und Campisi, 2008). Zur Erforschung von Alterungsprozessen eignet sich *Drosophila melanogaster* neben *Caenorhabditis elegans* aus ethischen und laborpraktischen Gründen besonders. Die durchschnittliche Lebensspanne beträgt 8-9 Wochen und ist durch Temperatur, Nahrung und genetische Manipulation flexibel zu beeinflussen. Da die am Alterungsprozess

beteiligten Gene und Signalwege evolutionär konserviert sind, lassen sich Erkenntnisse größtenteils auf höhere Organismen wie den Menschen übertragen. Es sind bereits etliche Gene in *Drosophila* beschrieben, die die Lebensspanne beeinflussen. Viele davon sind Komponenten des Insulin Signalwegs. So konnte gezeigt werden, dass hypomorphe Allele des *Drosophila* Insulinrezeptors, die zu einer verminderten Aktivierung des IIS führen, das Leben der Fliegen verlängerten (Tatar et al., 2001). Gleiches konnte für das *Caenorhabditis elegans* Ortholog des Insulinrezeptors Daf-2 und den IGF-1 Rezeptor in der Maus beobachtet werden (Kenyon et al., 1993; Kimura et al., 1997; Holzenberger et al., 2003). Ein weiteres Indiz für die zentrale Rolle des IIS bei der Regulation der Lebensspanne ist die Tatsache, dass alle beschriebenen Nullmutanten des Insulinrezeptors embryonal lethal sind (Chen et al., 1996). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass eine homozygote Mutation des *chico* Gens in *Drosophila* zu einer 50 %-igen Lebensverlängerung bei weiblichen Fliegen führte (Clancy et al., 2001). Chico ist das *Drosophila* Ortholog des IRS-1 und die Nulltmuation führt zu einer reduzierten IIS-Aktivität, da der INSR auch direkt in der Lage ist die PI3-Kinase zu phosphorylieren, ohne den Umweg über Chico gehen zu müssen. Dieses Phänomen konnte später auch im Mausmodell bestätigt werden (Selman et al., 2008). Ebenso konnte für Mutanten der PI-3 Kinase eine Lebensverlängerung beobachtet werden (Johnson et al., 1990; Ayyadevara et al., 2008). Für die Lebensverlängerung sind die stressinduzierten Transkriptionsfaktoren FOXO und HSF-1 („*heat shock transcription factor 1*“) hauptverantwortlich. Eine verstärkte Expression dieser Transkriptionsfaktoren führte zu einer Lebensverlängerung, während eine Depletion zu einer verkürzten Lebensspanne der Modellorganismen führte (Kenyon et al., 1993; Kimura et al., 1997; Lin et al., 1997; Ogg et al., 1997; Greer und Brunet, 2005). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Depletion dieser Faktoren bei gleichzeitiger Reduktion des IIS den lebensverlängernden Phänotyp wieder aufhob, was dafür spricht, dass beide Transkriptionsfaktoren über den IIS reguliert werden und verantwortlich für den lebensverlängernden Effekt sind (Hsu et al., 2003; Kenyon, 2005).

Die in den Kapiteln zuvor beschriebenen Mechanismen verdeutlichen die essentielle Funktion der Chaperon-assoziierten Ubiquitinligase CHIP für den Erhalt des Proteoms. Zudem führt der Verlust der CHIP-Funktion im Mausmodell zu einer verkürzten Lebensspanne und zu einem verfrühten Altern der Tiere. Somit scheint CHIP die Alterung unmittelbar zu beeinflussen, jedoch sind die molekularen Mechanismen bislang ungeklärt. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit die Funktion von CHIP in *Drosophila melanogaster* und dessen Einfluss auf die Proteostase während der Alterung untersucht werden.

3 Material

3.1 Allgemeine Materialien

3.1.1 Geräte

Folgende Geräte wurden verwendet:

Bezeichnung	Herkunft
Absaugsystem	AA12, HLC Biotech
Binokular	Olympus S2X 12 / Olympus SZ 40
Blotapparatur	Hoefer
Brutschrank	Rumed Typ 3001
Drehrad	Renner Mixing Rotor
Eismaschine	MF22-Scotsman
Elektrophorese Apparatur	HE33, Hoefer
Entwicklermaschine	Curix 60, AGFA
Feinwaage	SI-234, Denver Instruments
Gefrierschrank	Forma Scientific
Gel-Dokumentationssystem	Gel-Doc, Biorad
Infrarot-Scanner	Odyssey, LI-COR
Inkubator	Biotron, Binder
Kühlzentrifuge	Centrifuge 5415R, Eppendorf Centrifuge 5810R, Eppendorf
Lichtmikroskop	ID03, Zeiss
LSM	Axiovert 100M, Zeiss
Magnetrührer	MR2002, Heidolph
Mikropipetten	Eppendorf
Mounting Medium	Mowiol
Nassblot-Apparatur	Mighty Small Transphor, Amersham
Netzgeräte	Elektrophoresis Power Supply EPS 301, Amersham

PCR-Cycler:	Mastercycler Personal, Eppendorf CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System, Biorad
pH-Meter	PB-11, Sartorius
Photometer	Eppendorf
SDS-PAGE Apparatur	Mighty Small II, Amersham
Schüttler	KS 250 basic, IKA Labortechnik
Sterilbank	Microflow Biological safety cabinet NNI
Thermoblock	HLC Biotech QBT, Grant Industries
Tischzentrifuge	Biofuge pico, Heraeus
Ultrazentrifuge	Optima L-80 XP Ultracentrifuge, Beckmann Coulter
Vortex	Vortex-Genie 2, Scientific Industries
Waage	KB, Kern
Wasserbad	A 100, Lauda
Zentrifuge	Avanti J-25 Centrifuge, Beckmann Coulter

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Folgende Verbrauchsmaterialien wurden bezogen:

Materialien	Hersteller
Allgemeiner Laborbedarf	Faust, Meckenheim
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Plastikwaren	Roth, Karlsruhe, Sarstedt
Plastikwaren für Zellkultur	Greiner, Solingen
Plastikwarenn für Fliegenkulturen	Greiner, Solingen
Röntgenfilme	Fuji X-Ray Film Super RX, Düsseldorf
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckman Coulter, USA

3.1.3 Kits, Enzyme und Standards

3.1.3.1 Kits

BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford (USA)
CalPhos-Transfektions-Kit	Clonetech
iScript cDNA Synthese Kit	Biorad
JetPRIME Transfektions Kit	peqlab
Nucleobond AX 100 Plasmid Maxi Kit	Macherey-Nagel, Düren
Nucleospin Extract II	Macherey-Nagel, Düren
Oxyblot-Detektion-Kit	Milipore
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen

3.1.3.2 Standards

Gene Ruler DNA Ladder Mix 1kb	Fermentas, Heidelberg
Prestained Protein Standard Plus	BioRad, München

3.1.3.3 Enzyme

PCR Nucleotide Mix	Roche, Mannheim
Go-Taq Polymerase LC System	Fermentas, Heidelberg
Pfu-Polymerase	Fermentas Heidelberg
KOD-Polymerase	Millipore Eschborn
Restriktionsendonukleasen	Fermentas, Heidelberg
Fast Digest Restriktionsendonukleasen	Fermentas, Heidelberg
Complete Protease-Inhibitoren-Cocktail-Tabletten (50 x)	Roche Diagnostics GmbH

3.1.4 Chemikalien, Medien und Reagenzien

Soweit nicht anders erwähnt, waren alle Verbrauchskemikalien von der Qualität *pro analysis* und wurden von folgenden Firmen bezogen: Merck Euro Lab, Roth, Sigma-Aldrich, Fischer scientific. Zudem wurden alle Puffer, Lösungen und Medien mit zweifach destilliertem Wasser hergestellt. Alle Lösungen zur Aufreinigung von RNA wurden mit RNase freiem Wasser angesetzt. Alle Prozentangaben sind in Masse pro Volumen.

Folgende Puffer und Lösungen wurden verwendet:

Bezeichnung	Zusammensetzung
Ampicillin-Lsg. -20 °C	50 µg/ml
Ammoniumpersulfat (APS) -20°C	10 % Ammoniumpersulfat
Amylose-Matrix	New England Biolabs
Blockierungslösung 4 °C	2 % (w/v) Milchpulver in TBST
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco
DMSO	Sigma
DNA-Probenpuffer	Fermentas
dNTP's	Fermentas
ECL-Lösungen "West Pico" und West Femto	Gibco
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco
EDTA	0,5 M EDTA, pH 8,0
Fixierungslösung 4 °C	4 % Paraformaldehyd (w/v) in PBS
Glycin-Puffer	0,1 M pH 3,5
Kaliumhydrogenphosphat-Puffer	2M K_2HPO_4
Kanamycin	25µg/ml
Lysozym -20 °C	10 mg/ml in TE – Puffer
Milchpulver	Roth
MOPS/ KCl	20mM/ 100mM
Natrium-Phosphat-Puffer	200 mM NaH_2PO_4 200 mM Na_2HPO_4
Neutralisierungspuffer	1,5 M NaCl 0,5 M Tris pH 8
Ni-NTA-Agarose	Qiagen
NIPAGIN-Lösung 10 % 4 °C	10g Nipagin (4-Hydroxy-methylbenzoesäure) in 100 ml 70 % Ethanol
PBS 20x	2,6 M NaCl 140 mM Na_2HPO_4 60 mM NaH_2PO_4 pH 7, autoklaviert (45 min, 121°C)
PBT	0,3 % Triton in PBS
PBTN	2 % Eserum in PBT
Penicillin-Streptomycin-Mix	Gibco
Protein-G-Sepharose	Amersham Pharmacia
Restriktionsenzyme	Fermentas
RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 8 150 mM NaCl 1% IGEPAL CA-630 0,5 % DOC 0,1% SDS 1 Tablette Complete Proteaseinhibitor/ 50 ml
SDS	10 % SDS
SDS-Gel-Ladepuffer 5x	500 mM Tris

	10 % Mercaptoethanol
	15 % SDS
	0,5 % Bromphenolblau
	50 % Glycerol
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris
	192 mM Glycin
	0,1 % SDS
Sso Fast EvaGreen supermix qPCR	Biorad
TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat pH 8,0
	1 mM EDTA
TBST-Lösung	0,01 M Tris-HCl pH 7,5
	0,15 M NaCl
	0,05 % Tween-20
TE –Puffer	10 mM Tris-Hcl pH 8,0
	1 mM EDTA
TELT	50 mM Tris-Hcl pH 8.0
	62,5 mM EDTA
	2.5 M LiCl
	0,4 % Triton X-100
Transferpuffer 4 °C	25 mM Tris
	150 mM Glycin
	10 % Methanol
Trypsin/ EDTA	Gibco

3.1.5 Inhibitoren

Folgende Inhibitoren wurden verwendet:

Bezeichnung	Herkunft
Bafilomycin A1	LC-labs
Chloroquin	Sigma
Dynamin Inhibitor V.34-2	Calbiochem, Merck-Millipore
Insulin	Peptanova
MG-132	Peptanova
Paraquat	Sigma

3.2 Antikörper

3.2.1 Primärantikörper

Folgende Primäre Antikörper wurden verwendet:

Antigen	Spezies	Herkunft
Alpha-Aktinin	Ratte	Sigma
AKT	Kaninchen	Cell Signaling
AKT-p	Kaninchen	Cell Signaling
ATG7	Kaninchen	Novus Biological
Beta-Aktin	Maus	Abcam
CHIP-PC711	Kaninchen	Millipore
CHIP	Kaninchen	Millipore
Clean-Blot		Thermo Scientific
Flag (TM2)	Kaninchen	Sigma
γ -Tubulin	Maus	Sigma
His-6-tag	Maus	Serotec
Hsp/Hsc70	Maus	SPA822, Stressgen
Hsp/Hsc70	Kaninchen	Biogenes
Hsp90	Ratte	Abcam
Insulinrezeptor (beta)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology
INSR-beta	Kaninchen	Cell Signaling
INSR-beta	Kaninchen	GeneTex
Insulinrezeptor (<i>Drosophila</i>)	Kaninchen	Marr lab
dInR	Kaninchen	Biogenes
LC3	Kaninchen	Novus Biological
mTor	Kaninchen	Cell Signaling
mTor-p	Kaninchen	Cell Signaling
PDK1	Kaninchen	Cell Signaling
PDK1-p	Kaninchen	Cell Signaling
Ref(2)P/p62	Kaninchen	Biogenes
Stub1	Kaninchen	Abcam
TPR2	Kaninchen	Biogenes
Ubiquitin/ FK2	Maus	Biomol

3.2.2 Sekundärantikörper

Als sekundäre Antikörper zur Detektion im Western-Blot wurden folgende polyklonale Peroxidase-gekoppelten Antikörper eingesetzt:

Antigen	Spezies	Herkunft
Maus-IgG	Ziege	Sigma
Kaninchen-IgG	Ziege	Sigma
Ratten-IgG	Ziege	Sigma
Clean-Blot	diverse	Thermo Scientific
True-Blot	Ratte	Rockland

3.3 Primer (Oligonukleotide)

Alle Primer wurden von der Firma Biomol, Hamburg hergestellt.

Klonierungsprimer:

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'
Truncated-INSR-Forward	CAGGCCATGGCGGGCCCCCTCATCTTTGTC
Truncated-INSR-Reverse	CCGAGCGTGGAATTCTTAGGAAGGATTGGACCGAGGC
INSR full length Forward	CAGGAAGCTTGCGATGGCCACCGGGGGCCGGC
INSR full length Reverse	CGAGCGTGCGATCGTTAGGAAGGATTGGACCGAGGCAAGG
INSR-K1047-Forward	GCAATGCCAGGGACATCATCAGGGGTGAGGCAGAGACC
INSR-K1047R-Reverse	GGTCTCTGCCTCACCCCTGATGATGTCCCTGGCATTGCCC

qPCR-Primer:

Bezeichnung	Sequenz 5' – 3'
dActin-Forward	GCGTCGGTCAATTCAATCTT
dActin-Reverse	AAGCTGCAACCTCTTCGTCA
dCHIP1-Forward	AGACAAGCAACAGGAAATTGAG
dCHIP1-Reverse	GAAC TTCACGTTTCTTTTCGAC
dCHIP2-Forward	GATCTGCAATTAAAGGAGCAGG
dCHIP2-Reverse	GGTTCTTTATGATGGCCTTTGAG
dEF1-Forward	GATCTTCTCCTTGCCCATCC
dEF1-Reverse	GCGTGGGTTTGTGATCAGTT
dRp49-Forward	GCTAAGCTGTCGCACAAATG

dRp49-Reverse	GTTCGATCCGTAACCGATGT
hB2M-Forward	GCAAGCAAGCAGAATTTGGA
hB2M-Reverse	TGTCTTTCAGCAAGGACTGG
hGAPDH-Forward	TGAGAAGTATGACAACAGCCT
hGAPDH-Reverse	GATGATGTTCTGGAGAGCCC
hINSR-Forward1	CAGTGATGTGTTTCCATGCTC
hINSR-Reverse1	CACCCTTGATGATGTCCCT
hINSR-Forward2	AGAGGCTGAGAATAATCCTG
hINSR-Reverse2	TCTCTGGTCATTCCAAAGTC

3.4 Plasmide

Für die Klonierung und Amplifikation von Plasmiden wurde der Stamm *E.coli* TG1 verwendet. Die Expression von rekombinanten Proteinen erfolgte in *E.coli* BL21(DE3) und *E.coli* BL21(DE3) codon plus.

Bezeichnung	Herkunft / Referenz
pcDNA 3.1(+)	Expression von Proteinen ohne Tag in Säugerzellen unter Kontrolle eines viralen Promoters
pcDNA-CHIP	AG Höhfeld
pCMV-tag2b	Invitrogen, Karlsruhe
pCMV-tag2b-CHIP	AG Höhfeld
pCMV-tag2b-INSR-wt-human	Kloniert aus cDNA-Klon CD220, Addgene HindIII + PvuI
pCMV-tag2b-INSR-K1047R-human	Amplifikation des gesamten pCMV-tag2b-INSR-wt Vektor mit Primern, die die Punktmutation enthalten (siehe Primerliste)
pETM11	Stratagene Cloning Systems, CB Amsterdam
pETM11-INSR (C-Terminus)-human	Kloniert aus cDNA-Klon CD220, Addgene NcoI + EcoRI
pETM11-dInR	Kloniert von cDNA aus adulten Fliegen NcoI + XhoI

pMal-C2	New England Biolabs
pMal-C2-INSR (C-Terminus) human	Kloniert aus cDNA-Klon CD220, Addgene EcoRI + Hind III
LD40717- pOT2	Drosophila Genomics Resource Center, Bloomington, Indiana

3.5 siRNA

siRNA's wurden von Qiagen verwendet

siRNA	Zielgen
CHIP 1+5	humanes CHIP
ATG7 1+3	humanes ATG7

4 Methoden

4.1 Methoden im Umgang mit *Escherichia coli*

4.1.1 Kultivierung von Bakterien

Zur Kultivierung von Bakterien wurden alle Medien bei 121°C für 20 min autoklaviert.

LB-Medium:	1% Trypton/Pepton
	0,5% Hefeextrakt
	0,5% NaCl
	pH 7,5
LB-Agar:	LB-Medium + 1,5% Agar
Antibiotika-Stocklösungen:	200 mg/ml Ampicillin bzw. 50 mg/ml Kanamycin wurden steril filtriert und in einer 1:1000 Verdünnung in Flüssigmedien bzw. Agar eingesetzt

Die Kultivierung erfolgte sowohl in Flüssigkulturen als auch auf Agarplatten bei 37°C. Dabei wurden Flüssigkulturen bei 220 UpM geschüttelt. Zur Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* wurden die Kulturen je nach Anwendung zwischen 18-30°C für 1-4 Stunden inkubiert. Die Kulturen wurden anschließend sedimentiert und das Pellet wurde wahlweise zur Proteinaufreinigung genutzt oder aber zur Lagerung bei -80°C eingefroren.

4.1.2 Transformation chemisch kompetenter *E.coli* Zellen

30 µl der mit Calciumchlorid chemisch kompetent-gemachten *E.coli* Zellen wurden auf Eis aufgetaut und dann mit 0,5 -1 µg DNA versetzt. Der Ansatz wurde 10 min auf Eis inkubiert und dann 45 Sekunden einem Hitzeschock bei 42°C in einem Wasserbad ausgesetzt, bei dem sich die Effizienz der DNA-Aufnahme in Bakterien erhöht. Das Reaktionsgefäß wurde dann sofort 5 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde 300 µl LB-Medium hinzugegeben und die Proben wurden 1 Stunde in einem Tischschüttler bei 37°C unter schütteln inkubiert. Die transformierten Bakterien wurden entsprechend des geeigneten Selektionssystems auf einer Agarplatte (Ampicillin, Kanamycin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Gewachsene Kolonien enthalten den Vektor, da sie durch die vom Vektor-vermittelte Resistenz in der Lage sind auf dem Selektionsmedium zu wachsen.

4.1.3 Expression rekombinanter Proteine in *E.coli*

Unter Verwendung von bakteriellen Expressionsvektoren werden rekombinanten Proteine als Fusionsproteine mit unterschiedlichen „Tags“ exprimiert. Für analytische Ansätze wurden Einzelkolonien von BL21 *E.coli*-Zellen, die mit den Expressionskonstrukten der jeweiligen Vektoren transformiert wurden, über Nacht in LB-Medium mit 100 mg/ml Antibiotikum inkubiert. Die Übernachtskultur wurde 1:100 mit frischem LB-Medium (100mg/ml Antibiotikum) verdünnt und bei 25°C/ 37°C bis zu einer OD600 von 0,4-0,8 kultiviert. Es wurde jeweils 1 ml Kulturmedium abgenommen, die Zellen durch 1-minütige Zentrifugation bei 10.000 x g sedimentiert und bei -20°C aufbewahrt. Die verbliebenen Kulturen wurden durch IPTG-Zugabe (Endkonzentration 0,5 mM) induziert und für 2-3 Stunden bei 20-25°C inkubiert. Anschließend wurden die BL21-Zellen mit dem rekombinant-exprimierten Protein sedimentiert und als Pellet bei -20°C aufbewahrt oder wahlweise zur Lyse und anschließender Proteinaufreinigung verwendet. Die Induktion präparativer Ansätze erfolgte mit einem Endvolumen von 0,4 l Medium.

4.1.4 Bakterienstämme

Für die Klonierung und Amplifikation von Plasmiden wurde die Stämme *E.coli* TG1 und DH5- α verwendet. Die Expression rekombinanter Proteine erfolgte in *E.coli* BL21(DE3) und BL21 (DE3-codon plus).

4.2 Methoden im Umgang mit eukaryontischen Zellen

4.2.1 Kultivierung von Säugerzellen

Zellkulturmedien:	
HEK293-Zellen:	DMEM
	10% FCS
	100 IU/ml Penicillin/ Streptomycin
PBS:	137 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	8 mM Na ₂ HPO ₄
	1,4 mM KH ₂ PO ₄
	pH 7,4
	autoklaviert
Trypsin-Lösung:	0,05% Trypsin/EDTA

Die Zellen wurden als adhärente Einzelschicht bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit im entsprechenden Medium kultiviert. Zum passagieren der Zellen wurde bei einer Zellkonfluenz von 80-90% das Medium abgenommen und die adhärenenten Zellen 1 x mit PBS gewaschen. Ein Ablösen der Zellen wurde durch eine kurze Inkubation von 1-3 min bei 37°C mit 0,5-1 ml der Trypsin-Lösung (für 10 cm Schale) erreicht. Anschließend wurden die abgelösten Zellen in

vorgewärmtem Medium aufgenommen und resuspendiert. Ein Aliquot der so erhaltenen Zellsuspension wurde dann 1:5 (HEK293-Zellen) mit Medium verdünnt und davon 1 ml in 9 ml frisches Medium in eine neue Zellkulturschale überführt.

4.2.2 Transfektion mit Calciumphosphat

Die Transfektion erfolgte unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Transfektionskits (CalPhos Mammalian Transfection Kit, Clontech) nach Vorschrift des Herstellers. Bei größeren Transfektionsansätzen wurden folgende selbstangesezte Transfektionslösungen benutzt:

2x HBS:	1,6 g NaCl
	0,074 g KCl
	0,027 g Na ₂ HPO ₄
	0,2 g Glucose
	1,19 g HEPES
	pH auf genau 7,05 mit 0,5 M NaOH
	Einstellen auf Endvolumen 100 ml
	A.bdest auffüllen
	sterilfiltrieren
	Lagerung bei -20°C
CaCl₂-Lösung:	2,5 M CaCl ₂
	sterilfiltriert
	Lagerung bei -20°C

Die Zellen wurden so gesplittet, dass sie am Tag der Transfektion zu 40-60% konfluent waren. Vor Zugabe der Transfektionslösung wurde das alte gegen frisches Medium ausgetauscht. Für Transfektionen in 10 cm Kulturschalen wurde pro Schale folgender Transfektionsansatz pipettiert:

20-28 μg Plasmid-DNA

X μl H₂O

86,8 μl CaCl₂-Lösung

→ Endvolumen 700 μl

Die Plasmid-DNA wurde dabei zuerst in sterilem H₂O verdünnt und nach Zugabe der CaCl₂-Lösung kurz gevortext. Unter gleichzeitigem leichtem vortexen wurde die so erhaltene Lösung tropfenweise zu einer vorgelegten 2 x HBS-Lösung gleichen Volumens gegeben. Um die Bildung der Calciumphosphat-Präzipitate abzuschließen, erfolgte eine 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Das Präzipitat wurde im darauffolgenden Schritt tropfenweise auf die vorbereiteten Zellen pipettiert. Im Anschluss an eine Inkubationszeit von 8-16 h erfolgte nach einem zusätzlichen Waschschriff mit PBS, ein erneuter Mediumwechsel und eine abschließende Inkubation für 24-48 h. Bei Transfektionen in kleineren Kulturschalen wurden die Volumina des Ansatzes entsprechend der Wachstumsfläche angepasst. Zur Ermittlung der Transfektionseffizienz diente optional ein Kontrolltransfektionsansatz mit dem eGFP-Expressionsplasmid als Marker.

4.2.3 Liposomen-vermittelte Transfektion

Um HEK293-Zellen mit Plasmid-DNA oder wahlweise siRNA zu transfizieren, wurde das JetPRIME-Kit von Peqlab verwendet. Dazu wurden die Zellen in einer 6 cm-Schale zu einer Konfluenz von 25-40% ausgesät und mit 1-2 μg DNA bzw. 100-200 pmol siRNA transfiziert. Die weitere Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Nach 16 h wurde das Medium gewechselt und nach weiteren 32 h wurden die Zellen 1 x in PBS gewaschen und anschließend je nach Anwendung weiterverarbeitet.

4.3 Methoden im Umgang mit *Drosophila melanogaster*

Die jeweiligen Fliegenkreuzungen wurden in Käfige überführt, die auf eine Apfelsaftagarplatte gesetzt wurden. Als Nahrung diente täglich erneuerte Trockenhefe. Nach drei Tagen im Inkubator bei 25°C wurde mit dem Sammeln von Larven begonnen. Für Proteinextrakte und Immunfärbungen wurden die Apfelsaftagarplatten alle 4 h gewechselt, so dass möglichst nur Larven innerhalb eines Larvenstadiums verwendet wurden.

4.3.1 Fliegenfutter

Es wurde die vom Hersteller empfohlene Menge an Instant *Drosophila* Futter Mix (Jazz-Mix AS153-Fisher Scientific) verwendet. Dazu wurden 4 l VE-Wasser und die entsprechende Menge *Drosophila* -Futter Mix im Kochtopf gekocht, bis sich der darin enthaltene Agar vollständig gelöst hat. Nach 15 min wurde das Futter auf unter 60°C abgekühlt. Bei dieser Temperatur lässt sich die NIPAGIN-Lösung hinzugeben und das Futter mit einer Portionierungsspritze in die Futterröhrchen aliquotieren.

4.3.2 Apfelsaftagarplatten

Es wurden 85 g Agar in 4 l VE-Wasser aufgekocht und nach vollständiger Lösung auf 60 °C abgekühlt. Parallel dazu wurden 100 g Zucker in 1 l Apfelsaft gelöst und auf 60°C erhitzt. Beide Ansätze wurden vermischt und es wurden 40 ml 10 %ige NIPAGIN-Lösung hinzugegeben. Anschließend wurde der Apfelsaftagar in Petrischalen gegossen und getrocknet bis er fest war.

4.3.3 Fliegenlinien

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft
Act5C-Gal4	P{w[+mC]=Act5C-GAL4}{Abella, 2009 #28}17bFO1/CyO	Bloomington, Indiana

elav.-GAL4 L3	w[*]; P{w[+mC]=GAL4-elav.L}3	Bloomington, Indiana
elav-GAL4-L2	w[*]; P{w[+mC]=GAL4-elav.L}2/CyO	Bloomington, Indiana
elav-GAL4; UAS-DCR2	P{w[+mW.hs]=GawB}elav[C155] w[1118]; P{w[+mC]=UAS-Dcr-2.D}2	Bloomington, Indiana
GD34125	w[*]; P{w[+mC]=UAS-RNAi CHIP (CG5203)	VDRC; Wien
HMS00986	y1 sc* v1; P{TRiP.HMS00986}attP2 CHIP (CG5203)	TRIP, Bloomington
Lsp2-Gal4	y[1] w[1118]; P{w[+mC]=Lsp2-GAL4.H}3	B. Dauwalder
MHC-Gal4	w[*]; P{w[+mC]=GAL4-MHC}3	M. Winberg
Ppl-Gal4	w[*]; P{w[+mC]=ppl-GAL4.P}2	Bloomington, Indiana
PSwitch106	P{w[mW.hs]=Switch1}106	Bloomington, Indiana
TIGS-2	P(Switch-unk)TIGS-2	Scott Pletcher
Tubulin-GS	P(α Tub84B-Switch.K) ^a	M. Jünger
Wildtyp ⁻	w ¹¹¹⁸ als Wildtyp verwendet	Bloomington, Indiana

4.3.4 Fliegenhaltung

Zur Haltung und Zucht aller verwendeten *Drosophila*-Stämme wurden Standardmethoden verwendet (Roberts *et al.*, 1986). Die Fliegen wurden, wenn nicht anders beschrieben, bei einer Temperatur von 25°C und 65 % Luftfeuchtigkeit gehalten. Als Fliegenfutter wurde Instant *Drosophila* Futter-Mix von Fisher Scientific verwendet. Alle Stocks wurden in regelmäßigen Abständen von 2-5 Tagen je nach Experiment umgesetzt.

4.3.5 Ektopische Expression mittels des UAS-GAL4 Systems

Durch die Kreuzung von zwei transgenen Fliegenlinien, von denen die eine ein ins Genom inseriertes *gal4*-Konstrukt (Induktorkonstrukt) und die andere ein UAS-Konstrukt in einem P-Element (Effektorkonstrukt: zum Beispiel GD34125:UAS-RNAi-*chip* Konstrukt) besitzt, kommt es in den Nachkommen zur ektopischen Depletion der Transkriptionseinheit (hier *chip*) in dem Induktorkonstrukt-Muster (Brand und Perrimon, 1993). Das *gal4*-Induktorkonstrukt wird durch einen gewebsspezifischen Enhancer induziert und bewirkt die GAL4-Protein-Expression in dem

Enhancer-Muster. Dieses ektopisch exprimierte GAL4 bindet an GAL4-Bindungsstellen, die auch als Upstream Activation Sequence (UAS) bezeichnet werden. Durch die GAL4-Bindung an UAS wird dann die Expression der Transkriptionseinheit des Effektorkonstrukts ebenfalls im Enhancertypischen Muster induziert. Da das UAS-GAL4 System aus der Hefe stammt ist die Induktion in *Drosophila* am effektivsten bei 25-28°C. Noch höhere Temperaturen z.B. 37°C (ideal für Hefen) sind zwar für die Induktion förderlich bewirken aber in *Drosophila* Letalität.

4.3.6 Ektopische Expression mit Hilfe des „Geneswitch“ Systems

Sollte die Expression eines Proteins gewebespezifisch und zeitlich induzierbar sein, wurde das GAL4/UAS GeneSwitch System (GS) (Osterwalder et al., 2001; Roman et al., 2001) eingesetzt. Das modifizierte GAL4 ist erst dann in der Lage, an die UAS-Sequenz zu binden und die Transkription des Zielgens zu induzieren, wenn es mit dem Progesteron-Rezeptorantagonisten RU486 (Mifepriston, Sigma) interagiert und dimerisieren kann. Es wird bereits innerhalb von wenigen Stunden nach der Aufnahme wirksam. Zusätzlich zur zeitlichen Steuerung der Induktion ermöglicht dieses System auch eine dosisabhängige Expression durch die Konzentration des eingesetzten Mifepristons im Futter. Das Mifepriston wurde in 100 % Ethanol gelöst und dem Fliegenfutter in Konzentrationen von 50-80 µg/ml bei einer Temperatur von unter 60°C zugegeben wie in Poirier et al. 2008 beschrieben.

4.4 Molekularbiologische Methoden

4.4.1 DNA-Plasmidisolierung im kleinen Maßstab (Minipräparation)

Eine vereinzelte *E.coli* Bakterienkolonie von einer LB-Antibiotika-Platte wurde in 2,5 ml LB-Antibiotika-Medium angeimpft und ü.N. bei 37°C in einem Schüttler inkubiert. Nach einer 1-minütigen Zentrifugation bei 13.000 UpM wurde der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 200 µl TELT und 20 µl Lysozym durch Vortexen resuspendiert. Zum Bakterienaufschluss wurde die Suspension 5 min bei RT und anschließend 5 min bei 97°C

inkubiert bevor sie 5 min auf Eis abgekühlt wurde. Zur Pelletierung der präzipitierten genomischen DNA sowie der Proteine wurde 20 min bei 13.200 UpM und 4°C zentrifugiert, anschließend der Überstand mit der Plasmid-DNA abgenommen und mit 100 µl Isopropanol versetzt und gemischt. Die gefällte Plasmid-DNA wurde für 5 min bei 13.000 UpM und 4°C pelletiert und der Überstand verworfen. Mit 500 µl 70 %-igem Ethanol wurde das Pellet gewaschen und bei 13.000 UpM und 4°C für 5 min zentrifugiert. Nach Abnahme des Ethanols und einer 10-minütigen Trockenzeit wurde das Plasmid-DNA Pellet in 40 µl autoklaviertem A. bidest. gelöst.

4.4.2 DNA-Plasmidisolierung im grossen Maßstab (Maxi-präparation)

Mit dem Nucleobond AX 100 Kit der Firma Macherey-Nagel wurde die Isolierung von Plasmid-DNA im mittleren Maßstab vollzogen. 350 ml LB-Antibiotikum-Medium wurden mit einer auf einer LB-Antibiotikum-Platte vereinzelt Bakterienkolonie beimpft und ü.N. bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die Bakterienkultur wurde am nächsten Tag für 7 min bei 4°C und 7.000 UpM pelletiert. Anschließend erfolgte die DNA-Präparation nach Angaben des Herstellers.

4.4.3 RNA Präparation aus Säugerzellen

Humane HEK-293-Zellen wurden zu einer Zelldichte von 10^{-06} herangezogen. Nach transienter Transfektion wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in der Zellschale in Lysepuffer des Qiagen-RNA-Isolation-Kit's aufgeschlossen und Ultraschall behandelt. Weitere Schritte zur Aufreinigung von RNA erfolgten nach Angaben des Herstellers

4.4.4 RNA Präparation aus adulten Fliegen

15-20 männliche Fliegen wurden zunächst mit Kohlendioxid betäubt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit flüssigem Stickstoff überführt und schock-gefroren. Anschließend wurden sie im gefrorenem Zustand mit einem Pistill zermörsert bis zu einem homogenen weißlich-braunen Pulver. Es folgte die RNA-Aufreinigung nach Anweisungen des Qiagen-RNA-Isolation-Kit's. Die Elution erfolgte in 30 µl RNase-freiem Wasser. Es folgte die Konzentrationsbestimmung mit dem Eppendorf Photometer.

4.4.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration gelöster Nukleinsäuren wurde über die photometrische Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD_{260}) bestimmt. Dazu wurden die zu messenden Proben im Verhältnis 1:50 in VE-Wasser verdünnt, vermischt und in einer Küvette im Photometer bei 260 nm gegen VE-Wasser als Nullwert gemessen. Eine OD_{260} von 1 bei doppelsträngiger DNA (dsDNA) und bei einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors ließ sich die Konzentration von dsDNA in der Ausgangslösung nach folgender Formel berechnen :

$$c[\mu\text{g}/\mu\text{l}] = (OD_{260} \times 50 \mu\text{g}/\text{ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}) / 1000$$

Zusätzlich wurde auch die OD_{280} gemessen. Bei dieser Wellenlänge haben Proteine ihr Absorptionsmaximum. So konnte aus dem Verhältnis der beiden Absorptionswerte die Reinheit der dsDNA Proben bestimmt werden.

4.4.6 Enzymatischer Verdau von DNA durch Endonukleasen

Um DNA zu linearisieren oder ein DNA-Fragment aus einem Vektor zu schneiden, verwendet man 5 U Restriktionsendonukleasen (TypII) pro µg DNA. Die nur wenige Basenpaar-lange Erkennungs- bzw. Schnittstellen-Sequenz ist für jede Restriktionsendonuklease spezifisch. 0,5-1 µg DNA wurden mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen in einem Endvolumen von

10 -30 µl für etwa 1 h bei 37°C inkubiert. Zu präparativen Zwecken wurde dementsprechend mehr DNA verwendet und der Verdau länger vollzogen (2-5 h). Der auf die verwendeten Enzyme abzustimmende Puffer (A, B, L, M, H) wurde in einem Verhältnis von 1:10 zum Endvolumen hinzugegeben. Zusätzlich wurden die FastDigest Endonukleasen mit dazugehörigem FastDigest 10 x Puffer von Fermentas verwendet.

4.4.7 Elektrophorese im Agarosegel zur Trennung von DNA nach Länge

Zur Trennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe wurden diese auf Agarosegele (1 % Agarose in 1 x TAE-Puffer) aufgetragen und einem elektrischen Feld (80-100 V konstant) ausgesetzt. Die aufgrund ihrer Eigenladung negativ-geladenen DNA-Fragmente wandern in diesem Feld durch die Poren des Agarosegels von der Kathode zur Anode der Gelkammer. Dabei bestimmt die Größe der Fragmente ihre Wanderungsgeschwindigkeit durch die Poren des Gels. Nach Ende der Elektrophorese kann durch Vergleich der Laufstrecke der DNA-Fragmente und eines ebenfalls aufgetragenen Größenstandards die Länge der Fragmente bestimmt werden. Die Agarosekonzentration des Gels bestimmt hierbei den Größenbereich der optimalen Auftrennung. Zur Herstellung von Gelen wurde Agarose in TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht, auf etwa 50°C abgekühlt und in einen Gelträger gegossen. Zur späteren Visualisierung der DNS-Fragmente wurde dem Gel der in DNA interkalierende und unter UV-Licht fluoreszierende Farbstoff Gele-red in einer Endkonzentration von 1 µg/ml zugegeben. Das Gel wurde etwa 30 min bei RT ausgehärtet und dann in eine mit 1 x TAE-Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die DNA-Proben wurden mit 6 x Probenpuffer gemischt und in die Taschen des Gels gefüllt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele zur Detektion und Foto-Dokumentation auf einem UV-Transilluminator (366 nm) betrachtet und fotografiert. Bei präparativen Gelen wurde eine UV-Lampe mit energieärmerer Strahlung (302 nm) verwendet, die DNA-Fragmente mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und die DNA extrahiert.

4.4.8 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das Nucleospin Extract II Kit eingesetzt. Nach der elektrophoretischen Trennung der DNA-Fragmente wurden die entsprechenden Fragmente unter UV-Licht (302 nm) aus dem Gel ausgeschnitten, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben, gewogen und das doppelte Volumen NT-Puffer hinzugegeben. Das Gelstück im Puffer wurde dann im Thermomixer bis zum vollständigen Lösen des ausgeschnittenen Agarosestücks inkubiert (50°C, 1.000 UpM). Die Lösung wurde auf eine Säule überführt und dann zentrifugiert (1 min, 11.000 g, RT). Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit der gebundenen DNA mit 600 µl NT3-Puffer und anschließender zweimaliger Zentrifugation (2 min, 11.000 g, RT) gewaschen. Die Säule wurde 5 min bei RT getrocknet und dann die DNA mit 50 µl autoklaviertem VE-Wasser durch Zentrifugation (2 min, 11.000 g, RT) eluiert. Die eluierte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei –20°C aufbewahrt.

4.4.9 Ligation von DNA

Die Konzentration der einzelnen DNA-Fragmente wurde wie in Kapitel 4.1.4 bestimmt. Das Fragment und der Vektor (100-200 ng) wurden für die Ligation mindestens im Verhältnis 5:1 eingesetzt. Die Ligation erfolgte innerhalb von 16 h mit der T4-DNA-Ligase von Fermentas im vom Hersteller empfohlenen T4-Puffer bei 16°C.

4.4.10 DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzierung aller klonierten DNA-Konstrukte erfolgte durch die Firma GATC Biotech AG.

4.4.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifizierung von DNA

Um kleine Mengen DNA in-vitro zu vervielfältigen wird die Methode der Polymerase Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction) verwendet. Dazu wird zunächst die Matrizen-

DNA denaturiert, so dass sich ausgewählte Oligonukleotide (Primer) an den Nicht-Matrizenstrang des DNA-Fragments von Interesse komplementär anlagern können. Diese 5' bzw. 3' zu dem zu amplifizierenden Fragment liegenden Oligonukleotide dienen als Erkennungssequenz für die hitzestabile KOD-Polymerase aus dem Bakterium *Thermococcus kodakaraensis*, die eine Transkription des Gens oder DNA-Abschnitts vollzieht. Die Primer wurden von der Firma Biomol hergestellt. Die PCR besteht aus drei sich wiederholenden Zyklen: Zuerst wurde die dsDNA bei 94°C denaturiert, ohne hydrolysiert zu werden. Diese generierten Einzelstränge dienen als Matrize zur Anlagerung der Primer bei 50-70°C (primerspezifisch) und zur anschließenden DNA Synthese bei 72°C durch die KOD-Polymerase. Bei jedem neuen Durchlauf des Zyklus dient das zuvor synthetisierte DNA-Fragment als Matrize, dies erklärt die exponentielle Amplifizierung des DNA-Bereichs von Interesse. Nach 30-40 Zyklen (anwendungsabhängig) schließt sich eine mehrminütige Elongationsphase bei 72°C an, währenddessen die noch nicht vollständig synthetisierte DNA fertig gestellt wurde.

Reagenz	Menge
Matrizen-DNA	200-500 ng
5' Oligonukleotid	20 pm
3' Oligonukleotid	20 pm
5 x Green KOD-Puffer / 5	10 µl
dNTP-Lösung (je 10 mM)	3 µl
KOD-Polymerase/	1 µl
A. bidest. (autoklaviert)	Ad 50 µl

Phase	Temp.	Zeit
1. Initiale Denaturierung	97 °C	3 min
2. Denaturierung (zyklisch)	94 °C	45 Sek.
3. Primeranlagerung (zyklisch)	40-65 °C	45 Sek.
4. Elongation (zyklisch)	72°C	1-5 min
5. Phase 2-5 30 x wiederholen		
6. Elongation	72°C	10 min
7. Denaturierung	97°C	3 min
8. Kühlung	4 °C	dauerhaft

Zur Erhöhung der PCR Stringenz wurden die Primeranlagerungstemperatur und –zeit, sowie die Zyklenzahl variiert. Zusätzlich wurde anstatt der gängigen Taq-Polymerase die KOD-Polymerase verwendet, die eine 3′-5′-Korrekturlesefunktion aufweist.

Reagenz	Menge
Matrizen-DNA	200-500 ng
5′ Oligonukleotid	20 pm
3′ Oligonukleotid	20 pm
5 x KOD-Puffer	10 µl
dNTP-Lösung (je 10 mM)	3 µl
KOD-Polymerase	1 µl
A. bidest. (autoklaviert)	Ad 50 µl

4.4.12 Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

Die Analyse von Transkriptmengen erfolgte mittels quantitativer PCR (qPCR). Die RNA wurde mit dem RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) aus kultivierten HEK293-Zellen oder aus adulten Fliegen isoliert. Die cDNA wurde aus 0,5-1 µg der gesamten isolierten RNA der Zellen bzw. Fliegen generiert, in dem das iScript-cDNA-Synthesis Kit (Biorad) verwendet wurde. Zur Amplifikation

und Detektion der PCR-Produkte wurde die Sso7d-Fusion Polymerase (*Sulfolobus solfataricus*), der EvaGreen Farbstoff und der CFX1000 touch Cycler von Biorad verwendet. Alle Kits wurden nach den Angaben der Hersteller benutzt. Zur Normalisierung der isolierten RNA aus Fliegen wurden die Signale des ribosomalen Proteins rp49, Aktin und EF1 verwendet. Als Referenzgene der RNA aus HEK293-Zellen dienen Aktin, GAPDH und B2M. Die qPCR wurde wie folgt durchgeführt:

cDNA-Synthese

Reagenz	Menge
Isolierte RNA	500 ng
5' Oligonukleotid	20 pm
3' Oligonukleotid	20 pm
10 x IScript-Puffer	2 µl
IScript-Polymerase	1 µl
A. bidest (autoklaviert)	Ad 20 µl

Die cDNA-Synthese erfolgte bei 42°C für 45 min.

qPCR

Reagenz	Menge
cDNA-Mix:	
cDNA	1 µl (500 ng RNA in 20 µl cDNA-Synthese)
H ₂ O6,5 µl
Eva-Green-Mix:	
5' Oligonukleotid	0,5 µl (5pm)
3' Oligonukleotid	0,5 µl (5pm)
Eva-Green Farbstoff	6,5 µl
A. bidest (autoklaviert)	15 µl pro Ansatz

Phase	Temp.	Zeit
1. Initiale Denaturierung	97 °C	3 min.
2. Denaturierung (zyklisch)	94 °C	45 Sek.
3. Primeranlagerung (zyklisch)	68 °C	30 Sek.
4. Elongation (zyklisch)	72°C	2 min.
5. Phase 2-5 30 x wiederholen		
6. Elongation	72°C	7 min.
7. Denaturierung	97°C	3 min.
8. Kühlung	4 °C	dauerhaft

4.5 Proteinbiochemische Methoden

Für die Herstellung von Proteinextrakten wurden ausschließlich folgende Puffer verwendet:

MOPS/ KCl	RIPA
20 mM MOPS, pH 8	25 mM Tris, pH 8
100 mM KCl	150 mM NaCl
0,3 % Triton-20	0,1 % SDS
1x "Complete"	0,5% Natriumdeoxycholat
10 mM EDTA (optional)	1 % Nonidet-P40
	10% Glycerol
	2 mM EDTA
	1 x „Complete“

4.5.1 Herstellung von Proteinextrakten aus E.coli

Das Pellet der Zellen der analytischen Ansätze wurden in 1 ml PBS resuspendiert und anschließend mit SDS-Probenpuffer versehen (Endkonzentration 1x SDS), 3 Minuten bei 97°C inkubiert, bei 10.000 x g abzentrifugiert und 10 -20 µl auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen. Für die Aufarbeitung präparativer Ansätze wurden die Angaben des Herstellers wie folgt modifiziert. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden für 20 Minuten bei 4000 x g abzentrifugiert, mit eiskaltem 1x PBS gewaschen und bei -20°C aufbewahrt. Das Zellpellet der 400 ml Kultur wurde in 5 ml eiskaltem 20 mM MOPS/100 mM KCl+Protease Inhibitor resuspendiert. Die Zellen wurden über Ultraschall (je 4x 30s) mit gepulstem Schall (100%) bei 42W aufgeschlossen. Anschließend wurden die Lysate für 30 Minuten bei 10.000 x g abzentrifugiert. Die Überstände wurden für die Reinigung der löslichen Fusionsproteine durch Affinitätschromatographie verwendet, die Pellets wurden als Kontrolle mit 1 x SDS-Probenpuffer aufgekocht und mit aufs SDS-Gel aufgetragen. Die Messung der Proteinkonzentration wurde wie in Kapitel 4.5.4. beschrieben durchgeführt. Zur Kontrolle der Induktion wurde die SDS-PAGE mit Coomassie blue gefärbt. Das Coomassie Reagenz färbt unspezifisch alle Proteine im Gel.

4.5.2 Herstellung von Proteinextrakten aus Säugerzellen

Zur Gewinnung von Zellextrakten aus kultivierten Säugerzellen wurden diese zunächst mit eiskaltem PBS gewaschen und dann durch Zugabe von RIPA-Puffer und einer 20-minütigen Inkubation auf Eis lysiert. Gegebenenfalls wurden die Zellen noch mit 4 x 30 Sek Ultraschall behandelt. Die löslichen Bestandteile des Lysates wurden anschließend durch eine 20-minütige Zentrifugation bei 4°C und 13.200 UpM in der Eppendorf Tischzentrifuge von den unlöslichen Zelltrümmern separiert. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein neues vorgekühltes Gefäß überführt und es wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford (Kapitel 4.5.4) durchgeführt. Der frischgewonnene Extrakt konnte nun für weitere Versuche verwendet werden.

4.5.3 Herstellung von Proteinextrakten aus adulten Fliegen

Zur Extraktion von Proteinen aus adulten Fliegen wurden 5-10 männliche Fliegen mit Kohlendioxid betäubt und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß in flüssigen Stickstoff überführt und schock-gefroren. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Anschließend wurden die gefrorenen Fliegen mit einem Pistill im Eppendorf-Gefäß zermörsert bis zu einem homogenen weißlich-braunen Pulver. Es folgte die Lyse mit 100 µl RIPA-Puffer mit SDS und Protease-Inhibitor (50 x Complete). Das Lysat wurde weitergehend mit dem Pistill homogenisiert und anschließend mit 5 x 30 Sek Ultraschall behandelt. Zwischen den Intervallen der Homogenisationsschritten mit Ultraschall wurde das Lysat jeweils mindestens 1 min auf Eis gekühlt. Nach einer 20 min Inkubation bei 4°C wurde das Lysat bei 13.200 UpM für 20 min pelletiert. Der Überstand mit den gelösten Proteinen wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues vorgekühltes Reaktionsgefäß pipettiert. Es folgte eine Proteinkonzentrationsbestimmung wie im folgenden Kapitel 4.5.4 beschrieben wird. Wenn nicht anders dokumentiert wurden alle Proben auf 4 µg/µl eingestellt und mit SDS-Probenpuffer versetzt.

4.5.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde photometrisch nach der Methode von Bradford bestimmt. Dies erfolgte unter der Verwendung des Protein Assay Kit's (BioRad) und Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm. Zuvor wurde das Photometer durch eine standardisierte IgG-Verdünnungsreihe (Sigma) geeicht. Der Nachweis der Proteine beruht auf der Biuret-Reaktion. Proteine bilden einen Komplex mit den Cu^{2+} -Ionen im alkalischen Nachweisreagenz. Hierbei werden die Cu^{2+} -Ionen zu Cu^+ -Ionen reduziert. Diese einfach positiv geladenen Ionen bilden wiederum einen intensiv-gefärbten Chelatkomplex mit der ebenfalls im Nachweisreagenz enthaltenen Bicinchoninsäure (BCA), der sein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 562 nm hat. Je mehr Protein die eingesetzte Probe enthält, desto mehr Komplexe entstehen und desto größer ist die Absorption von Licht der Wellenlänge 562 nm. Diese Absorptionsänderung kann photometrisch gemessen und quantifiziert werden. Zur Umrechnung der Absorptionswerte auf eine Proteinkonzentration wurden Eichkurven erstellt, aus denen sich für jeden Absorptionswert die entsprechende Proteinkonzentration errechnen ließ. Diese Eichreihen wurden durch Messung einer Konzentrationreihe von BSA (Rinderserum) bekannter Konzentration im entsprechenden Lysispuffer erstellt. Für die Messung der Proteinkonzentration der entsprechenden Proben wurde jeweils 1 µl Probe in 19 µl bidestilliertem Wasser verdünnt und 980 µl BSA-Lösung hinzugegeben. Die Ansätze wurden gründlich gemischt und für 7 min. bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Es wurden stets Doppelbestimmungen durchgeführt. Anschließend wurde der Durchschnittswert errechnet. Als Nullwert wurden 20 µl bidestilliertes Wasser und 980 µl BSA-Lösung eingesetzt.

4.5.5 Proteinfällung

Zur Konzentrierung von Proteinproben wurde eine Fällung der Proteine mit Trichloressigsäure (TCA) durchgeführt. Dazu wurden die Proteinlösungen mit 50%-iger TCA-Lösung auf eine 12,5%-ige TCA-Konzentration eingestellt und anschließend für mindestens 20 min oder über Nacht auf Eis inkubiert. Die ausgefallenen Proteine wurden durch eine 30-minütige Zentrifugation bei 4°C und 13.200 UpM pelletiert. Nach vollständiger Entfernung des TCA-haltigen Überstandes wurden die Proteinpräzipitate dann in 1 x SDS-Probenpuffer gelöst und aufgekocht. Der pH wurde gegebenenfalls durch Zugabe von 1-2 µl 1 M Tris pH 9,0 neutralisiert.

4.5.6 SDS – Polyacrylamid–Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei dieser diskontinuierlichen Gelelektrophorese nach Laemmli bewegen sich Proteine in einem elektrischen Feld zwischen einer Kathode und einer Anode durch ein Molekularsieb und werden dabei entsprechend ihrem Molekulargewicht durch unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten aufgetrennt. Als Molekularsieb dient Polyacrylamid. Ein Polyacrylamidgel erhält man durch radikalische Polymerisation von Acrylamidmonomeren und Bis-Acrylamid als Vernetzer. Proteine wurden in denaturierter Form zusammen mit dem anionischen Detergenz Natrium Dodecyl Sulfate (SDS) auf das Gel aufgetragen, was zu einer vollständigen Auflösung aller nicht-kovalenten Bindungen des Proteins führt. SDS bildet mit dem Protein einen negativ geladenen Komplex, indem es an durchschnittlich jede zweite Aminosäure bindet. Die natürliche Eigenladung der Aminosäuren wird dabei durch das SDS maskiert. Die Trennung erfolgt also nur nach dem Molekulargewicht des Proteins. Die Auftrennung erfolgt in zwei unterschiedlichen Gelabschnitten. Im großporigen Sammelgel (5 %) bei einem pH-Wert von 6,8 wandern die SDS-Proteine-Komplexe zwischen den kleinen, negativ-geladenen Chlorid-Ionen und den bei diesem pH-Wert netto nicht geladenen Glycin-Zwitterionen (isoelektrischer Punkt bei pH 6,8) durch das Gel, was zu einer Konzentrierung der Proteine führt. Treffen die Proteine nun auf das feinporige (7,5-12,5 %) Trenngel mit einem pH-Wert von 8,8, erhalten die Glycin-Ionen eine negative Nettoladung und überholen die weitaus größeren SDS-Proteine-Komplexe im Gel. Die SDS-Protein-Komplexe trennen sich nun entsprechend ihres Molekulargewichts auf. Um das Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine zu bestimmen, wurde ein Protein Größenstandard (Prestained Standard Protein Plus, BioRad) auf jedes Gel mit aufgetragen und aufgetrennt. Die Proteinkonzentration in den Proben wurde durch Verdünnung mit Lysispuffer auf 4 µg/µl eingestellt. Die Proben wurden mit 3 x SDS-Probenpuffer versetzt, so dass er in einfacher Konzentration in den aufgetragenen Proben vorlag. Die Proben wurden 3 min bei 97°C denaturiert, kurz anzentrifugiert und dann auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 20 mA pro Gel bei RT durchgeführt.

Puffer	Reagenzien
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris 190 mM Glycin 1% SDS
Probenpuffer (3x)	0,2 M Tris/HCl, pH 6,8 6% SDS 30% Glycerol 0,03% Bromphenolblau 15% β -Mercaptoethanol

Trenngel nach Laemmli (für 10 Gele)				
Gelkonzentration	7,5%	10%	12,5%	15%
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	15,2 ml	15,2 ml	15,2 ml	15,2 ml
30% Acrylamid (0,8% BisAA)	15,1 ml	20 ml	25,2 ml	30,2 ml
H ₂ O	28,9 ml	24 ml	18,7 ml	13,7 ml
10% SDS	890 μ l	890 μ l	890 μ l	890 μ l
10% APS	390 μ l	390 μ l	390 μ l	390 μ l
TEMED	38 μ l	38 μ l	38 μ l	38 μ l

Sammelgel (für 5 Gele)	
1M Tris/HCl, pH 6,5	2 ml
30% Acrylamid (0,8% BisAA)	1,33 ml
H ₂ O	4,41 ml
10% SDS	240 μ l
10% APS	80 μ l
TEMED	8 μ l

4.5.7 Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen

Lösung	Reagenzien
Coomassie-Lösung	50% Methanol 10 % Essigsäure 0,125% Coomassie Brilliant Blue R-250
Entfärbelösung	50% Methanol 10% Essigsäure

Die zu färbenden Gele wurden kurz in Färbelösung aufgekocht und anschließend für 20 min bei Raumtemperatur geschwenkt. Nach Entfernung der Färbelösung wurden die Gele kurz mit A. bidest. gewaschen und dann in Entfärbelösung auf dem Schüttler inkubiert, bis die Proteinbanden sichtbar wurden.

4.5.8 Kolloidale Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen

Lösung	Reagenzien
Coomassie-Lösung	20% Methanol 10 % Ammoniumsulfat 10% Phosphorsäure 0,12% Coomassie Brilliant Blue G-250
Entfärbelösung	A. bidest.

Die zu färbenden Gele wurden zunächst 2 x 10 min mit bidestilliertem Wasser gewaschen und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur in Färbelösung geschwenkt. Nach Entfernung der Färbelösung wurden die Gele 24 h mit A. bidest. entfärbt bis die Proteinbanden sichtbar wurden.

4.5.9 Transfer von Proteinen auf eine Nitrocellulose-Membran (Western Blot, Nass-Blot-Verfahren)

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden zur späteren Immundetektion vom Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Dazu werden die SDS-Protein-Komplexe einem elektrischen Feld ausgesetzt und bewegen sich aus dem Gel von der Kathode zur Anode auf die Nitrocellulosemembran zu. Das SDS löst sich langsam im elektrischen Feld, was durch den Einsatz von Methanol im Transferpuffer verstärkt wird. Ist das SDS von den Proteinen gelöst, können diese mit der hydrophoben Nitrocellulosemembran interagieren und werden immobilisiert. Bei dem hier angewendeten Nass-Blot-Verfahren wird der Proteintransfer mit Transferpuffer im Blottank durchgeführt. Alle verwendeten Komponenten wurden kurz in Transferpuffer äquilibriert. Der Blot-Aufbau bestand aus einem Schwamm, einer Schicht Whatman Filterpapier, dem Polyacrylamidgel, der Nitrocellulosemembran, einer weiteren Schicht Whatman Filterpapier und einem Schwamm. Der Blot wurde dann zwischen zwei Gitter in eine Halterung geklemmt und in den mit Transferpuffer befüllten Blottank gehängt. Das Gel wurde dabei zur Kathode, die Membran zur Anode orientiert. Der Transfer erfolgte für 1,5 h bei 300 mA und 300 Volt. Die Membran wurde anschließend zur Kontrolle des Proteintransfers mit Ponceau S gefärbt. Diese Färbelösung färbt Proteine unspezifisch an und ist reversibel.

4.5.10 Immundetektion („Western-Blot“)

Zum spezifischen Nachweis einzelner Proteine wurde eine Immundetektion durchgeführt. Das Prinzip der Immundetektion ist die hoch spezifische Bindung der Paratope von Antikörpern an die entsprechenden Epitope der Proteine. Dazu werden Primärantikörper gegen die auf Membranen immobilisierten Proteine eingesetzt. Die Antikörper binden dort, wo die Proteine mit den entsprechenden Epitopen auf der Membran vorliegen. Nun wird die Membran mit einem Sekundärantikörper inkubiert, der spezifisch an die Fc'-Region eines Antikörpers bindet. Die Fc'-Region eines Antikörpers unterscheidet sich von Organismus zu Organismus und so gibt es Sekundärantikörper gegen die Primärantikörper aus den Organismen, in denen sie hergestellt wurden. An diese Sekundärantikörper kann eine Peroxidase gekoppelt sein, die bei Zugabe einer Luminol-haltigen Detektionslösung zu einer Umsetzung des Luminols führt und in eine

Lichtemission resultiert. Diese Lichtemission wird auf einem Röntgenfilm detektiert. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Arbeitsschritte bei RT auf einer Wippe durchgeführt. Die Membran wurde nach der Färbung mit Ponceau S 2 x 5 min mit bidestilliertem Wasser gewaschen, daraufhin zur Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen für 30 min auf einer Wippe in Blockierungslösung (2% Milch in TBST, 3% BSA in TBST) inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 2 x kurz, 2 x 10 min mit TBST gewaschen und 1 h mit dem Primärantikörper (Verdünnung 1: 10.000 in Blockierungslösung) inkubiert, dann 2 x kurz, 2 x 10 min gewaschen und anschließend mit dem HRP (Horse Redish Peroxidase)-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Es folgten weitere Waschschrte (2 x kurz, 2 x 10 min). Die Detektion wurde mit dem Pierce ECL System nach Herstelleranleitung durchgeführt. Dazu wurde die Membran 1 min in der frisch angesetzten Detektionslösung inkubiert und anschließend die Lichtemission mit Röntgenfilmen in der Dunkelkammer detektiert.

4.5.11 Aufreinigung von Histidin-Fusionsproteinen in *E. coli*

Pufferlösung	Reagenzien
Lysepuffer:	20 mM MOPS, pH 7,5 100mM KCl 20 mM Imidazol, pH 8,0 1 x „Complete“
ATP-Waschpuffer:	20 mM MOPs, pH 7,5 100 mM KCl 20 mM Imidazol, pH 8,0 1 mM ATP 1 mM MgCl ₂
Elutionspuffer:	20 mM MOPS, pH 7,5 100 mM KCl 200 mM Imidazol, pH 8,0

Die Expression rekombinanter Histidin-Fusionsproteine erfolgte in *E.coli BL21(DE3)*. Die Lyse der Bakterienzellen erfolgte in 5 ml Lysepuffer pro g Pellet durch 5 x 20 Sek sonifizieren auf Eis. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 13.000 UpM und 4°C für 30 min sedimentiert. Zum Extrakt wurde 1 ml pro 5 ml Extrakt in Lysepuffer gewaschene, 50%-ige Ni-NTA-Matrix in Lysepuffer zugegeben und 2 h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Die Ni-NTA-Matrix wurde bei 2.000 UpM, 4°C für 1 min abzentrifugiert. Es folgten 6 Waschschrte mit Lysepuffer um unspezifische, an die Matrix-gebundene Proteine zu entfernen. Durch 10 min Inkubation mit ATP-Puffer bei RT wurden Proteine, die ATP-abhängig an das Fusionsprotein binden, entfernt. Die Elution der Proteine von der Matrix erfolgte mit Elutionspuffer in 3 Fraktionen je 1 ml auf Eis. Anschließend wurde die Proteinkonzentration nach Bradford gemessen (Kap. 4.5.4), die Eluate aliquotiert und bei -80°C gelagert. Mittels einer SDS-PAGE (Kap. 4.5.6) und anschließender Coomassie-Färbung des Gels (Kap. 4.5.7) wurde die Reinheit des Proteins kontrolliert. Dazu wurden die Proben der Lysate, des Extrakts, des Überstands nach der Bindung an die Ni-NTA-Matrix und des Eluats auf ein Gel aufgetragen.

4.5.12 Aufreinigung von MBP-Fusionsproteinen in *E. coli*

Pufferlösung	Reagenzien
Lysepuffer:	20 mM MOPS pH 7,2
	200 mM NaCl
	1 mM EDTA
	1 x „Complete“
Elutionspuffer:	20 mM MOPS, pH 7,2
	200 mM NaCl
	1 mM EDTA
	10 mM Maltose

Das MBP („maltose binding protein“)-Fusionsprotein wurde rekombinant in *E.coli BL21(DE3)* exprimiert. Für die Reinigung von MBP-Fusionsproteinen wurde dem Kulturmedium 0,2% Glucose beigelegt, um die Expression von Amylasen zu unterdrücken, die zu einer Spaltung der

Amylose-Matrix führen könnten. Die Bakterien wurden in 5 ml Lysepuffer durch Sonifizierung (5 x 20 Sek) aufgeschlossen. Durch Zentrifugation bei 4.000 x g für 30 min wurden Zelltrümmer sedimentiert. Der Protein enthaltende Überstand wurde mit 1-2 ml in Lysepuffer gewaschener, 50%-iger Amylose-Matrix für 2 h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Anschließend wurde die Matrix 6 x mit Lysepuffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Die MBP-Fusionsproteine wurden in 3 Fraktionen mit je 1 ml Elutionspuffer von der Amylose-Matrix eluiert. Es folgte die Bestimmung der Proteinkonzentration (Kap. 4.5.4). Die Eluate wurden aliquotiert und bei -80°C gelagert. Abschließend wurden Proben der Lysate, des Extrakts und des Eluats auf ein Gel aufgetragen, und mittels einer SDS-PAGE (Kap. 4.5.6) und anschließender Coomassie-Färbung des Gels (Kap. 4.5.7) wurde die Reinheit des Fusionsproteins ermittelt.

4.5.13 *in-vitro*-Ubiquitinierung

Pufferlösung	Reagenzien
Puffer:	25 mM MOPS pH 7,2 100 mM KCl
ATP-Puffer:	50 mM ATP 50 mM MgCl ₂ 100 mM DTT (frisch angesetzt)
gereinigte Proteine:	2 µM MBP-INSR-C-Terminus 0,1 µM E1 Weizen (AG Höhfeld) 2 µM UbcH5b (AG Höhfeld) 2 µM CHIP (AG Höhfeld) 0,3 µM Hsp40 (AG Höhfeld) 2 µM Hsc70 (diese Arbeit) 2,5 µg/µl Ubiquitin (Sigma)

Zur Untersuchung des Einflusses von CHIP auf die Ubiquitinierung des Insulinrezeptors wurden gereinigte Komponenten mit Puffer in einem Volumen von 50 µl zu den angegebenen Konzentrationen verdünnt. Die Ubiquitinierungsreaktion wurde durch die Zugabe von 1/10 Volumen ATP-Puffer gestartet und erfolgte bei 30°C für 2 h. Durch Zugabe von 25 µl 3 x SDS-Probenpuffer wurde die Ubiquitinierung gestoppt. Die Proben wurden schließlich für 3 min bei 93°C aufgekocht. Die Ubiquitinierung konnte mittels SDS-PAGE (Kap. 4.5.6) und Western-Blot (Kap. 4.5.9-10) analysiert werden.

5 Statistik

5.1 Überlebensexperimente

Abb.	Genotyp	Mittlere Lebensspanne in Tagen \pm S.E.M.	Anzahl n	P-Wert im Vergleich zur Kontrolle
6.3 A	<i>actin</i> -GAL4/ w ¹¹¹⁸	54.78 \pm 0.76	289	
	<i>actin</i> -GAL4/ RNAi- <i>dCHIP</i> (GD34125)	29.66 \pm 0.26	328	< 0.0001 (***)
6.3 B	<i>actin</i> -GAL4/ w ¹¹¹⁸	63.24 \pm 1.19	175	
	<i>actin</i> -GAL4/ RNAi- <i>dCHIP</i> (HMS00986)	37.62 \pm 0.73	181	< 0.0001 (***)
6.3 C	<i>TubGS</i> / RNAi- <i>dCHIP</i> EtOH	49,82 \pm 1,13	197	
	50 μ g/ml RU486 (Mifepriston)	37,21 \pm 0,84	208	< 0.0001 (***)
6.4	<i>MHC</i> -GAL4/ w ¹¹¹⁸	60.98 \pm 0.77	237	
	<i>MHC</i> -GAL4/ RNAi- <i>dCHIP</i>	63.63 \pm 0.81	226	n. s.
6.5	<i>elav</i> -Gal4; UAS-DCR2/ w ¹¹¹⁸	72,54 \pm 0,92	129	
	<i>elav</i> -Gal4; UAS-DCR2/ RNAi- <i>dCHIP</i>	73,07 \pm 0,88	134	n. s.
	<i>elav</i> -GS/ RNAi- <i>dCHIP</i> EtOH	72,54 \pm 0,92	193	
	50 μ g/ml RU486 (Mifepriston)	73,07 \pm 0,68	195	n. s.
6.6	<i>PSwitch106</i> / RNAi- <i>dCHIP</i> EtOH	67,46 \pm 0,93	215	
	<i>PSwitch106</i> / RNAi- <i>dCHIP</i> 80 μ g/ml RU486	50,15 \pm 0,89	193	< 0.0001 (***)

<i>ppl</i> -GAL4/ w ¹¹¹⁸	67,31 ± 0,52	181	
<i>ppl</i> -Gal4 /RNAi- <i>dCHIP</i>	66,23 ± 0,84	194	n. s.
<i>Lsp2</i> -Gal4/ w ¹¹¹⁸	67,7 ± 0,81	179	
<i>Lsp2</i> -Gal4/ RNAi- <i>dCHIP</i>	66,8 ± 0,75	181	n. s.
<i>TIGS-2</i> / RNAi- <i>dCHIP</i>	64,65 ± 1,02	259	
<i>TIGS-2</i> / RNAi- <i>dCHIP</i> 80 µg/ ml RU 486	42,86 ± 0,6	273	< 0.0001 (***)

6 Ergebnisse

6.1 Analyse des CHIP Proteins (DCHIP) in *Drosophila melanogaster*

6.1.1 Das *Drosophila* Ortholog DCHIP

Das *Drosophila*-Gen „carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein“ (*Dchip*) ist cytogenetisch auf Chromosom 2L im Bereich 31E2 lokalisiert und umfasst einen 1,694 Kilobasen (kb) großen Genabschnitt. Das Gen selbst besitzt 6 Exons und 5 Introns und exprimiert ein putatives Transkript mit der Länge von 1278 Nukleotiden. Der im Transkript befindliche offene Leserahmen (ORF= „open reading frame“) erstreckt sich von Exon 1 bis Exon 6 und umfasst 867 Basenpaare (bp) (Abbildung 6.1 A).

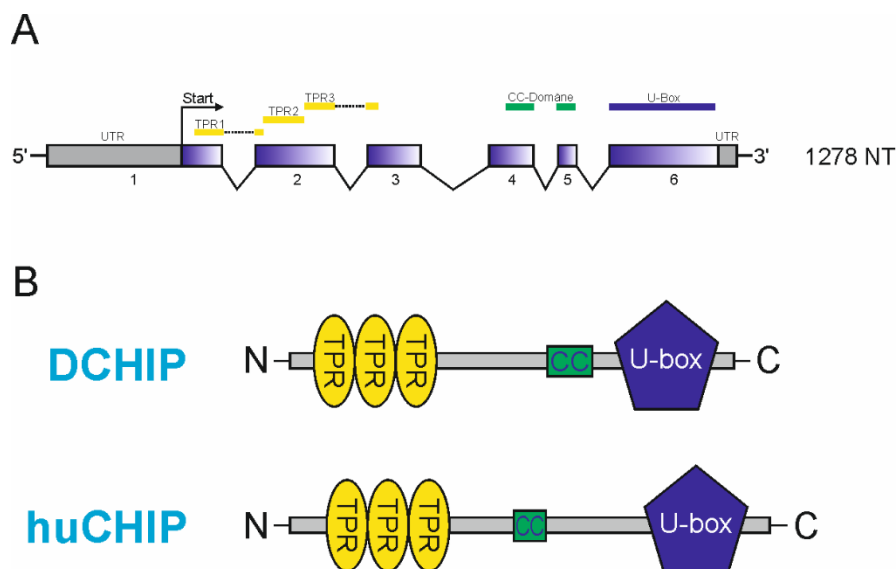


Abbildung 6.1: Das *Drosophila* Ortholog von CHIP ist dem humanen CHIP sehr ähnlich.

(A) Schematische Darstellung des *Dchip* Gens. Exons sind als blaue Kästchen dargestellt, Introns als schwarze Linien. Die untranslatierte Region des Gens ist in grau dargestellt. Zusätzlich sind die Bereiche farblich markiert, in dem sich die charakteristischen Domänen befinden. (B) Vergleich der Domänenstruktur von *Drosophila* CHIP und humanem CHIP. Über die drei N-terminal gelegenen TPR-Domänen (TPR1-3, gelbe Ovale) erfolgt die Interaktion mit dem C-Terminus von Hsc70 oder Hsp90. Die helikale *coiled-coil*-Domäne (grüner Kasten) vermittelt die Oligomerisierung der Ubiquitinligase. Die U-Box-Domäne (U-Box) dient der Rekrutierung von Ubiquitin-konjugierenden Enzymen (blaues Fünfeck).

Der ORF codiert für ein 289 Aminosäuren großes Protein mit einem vorhergesagten Molekulargewicht von 34 kDa. Das *Drosophila*-CHIP (DCHIP) ist dem humanen CHIP sehr ähnlich (52% Identität und 69% Ähnlichkeit) und besitzt eine identische Domänenstruktur (Abb. 6.1 B). Die TPR- und U-Box-Domänen sind zwischen dem humanem CHIP und DCHIP hoch konserviert und essentiell für die Aktivität als Chaperon-assoziierte Ubiquitinligase.

6.1.2 Expressionsanalyse des DCHIP Proteins in adulten *Drosophila melanogaster*

Um das bislang weitestgehend unbekannte Expressionmuster des DCHIP-Proteins in adulten Fliegen zu analysieren, wurden verschiedene Proteinextrakte hergestellt. Dabei wurde eine grobe Einteilung in die 3 Körperteile Kopf, Thorax und Abdomen der Fliege vorgenommen. Der Kopf besteht hauptsächlich aus dem Gehirn mit den beiden Komplexaugen und kann daher als vorwiegend aus zentralem Nervensystem (ZNS) bestehend angesehen werden. Der Thorax ist vorwiegend aus Bein- und Flugmuskulatur aufgebaut und steht daher für die Muskulatur im Allgemeinen. Im Abdomen findet man Organe wie den Darm, die Malphigischen Gefäße und den Fettkörper.

In Abb.6.2 ist zu erkennen, dass DCHIP ubiquitär exprimiert ist. In der Muskulatur konnte, wie zu erwarten war, eine starke Aktin-Expression detektiert werden, jedoch nur eine schwache DCHIP-Expression. Im Kopf und im Abdomen konnte hingegen eine starke Expression von DCHIP nachgewiesen werden. Demnach ist DCHIP verstärkt im Kopf und im Abdomen exprimiert.

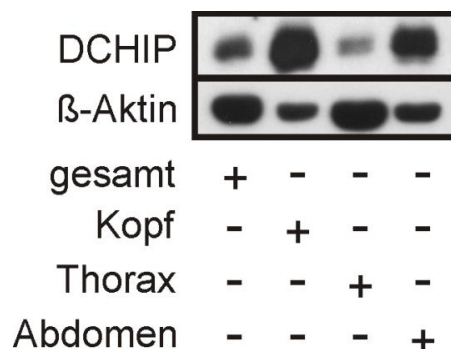


Abbildung 6.2: Expressionsmuster des DCHIP Proteins in adulten Fliegen. Wildtyp Fliegen des Genotyps *w¹¹¹⁸* wurden in die 3 folgenden Körperteile aufgetrennt, den Kopf (ZNS), Thorax (Muskulatur) und Abdomen (Stoffwechselorgane). Aus den Körperteilen wurden Proteinextrakte hergestellt und im Western-Blot wurde die DCHIP-Expression untersucht. DCHIP wird ubiquitär in adulten Fliegen exprimiert. Dabei konnte eine starke Expression im Kopf und Abdomen und eine schwächere Expression im Thorax detektiert werden. Es wurden jeweils 40 µg Protein aufgetragen.

6.1.3 Ubiquitäre Depletion von DCHIP

Um Rückschlüsse auf die physiologische Funktion von DCHIP in *Drosophila melanogaster* ziehen zu können, wurde DCHIP mit Hilfe der RNAi-Linien GD34125 (VDRC) und HMS00986 (Bloomington) spezifisch depletiert. Dazu wurde zunächst die ubiquitär konstitutive Treiberlinie *Aktin-Gal4* verwendet. Die ubiquitäre Depletion von DCHIP führte zunächst zu keinem erkennbaren Phänotyp. Die Fliegen entwickelten sich normal und erreichten das adulte Stadium. Es waren keine Unterschiede zur Kontrolle hinsichtlich ihrer Größe, Gewicht oder Agilität erkennbar (Daten nicht gezeigt). Demnach konnte ein Entwicklungsdefekt aufgrund der DCHIP Depletion zunächst ausgeschlossen werden. Jedoch wurde offensichtlich, dass die Depletion von DCHIP im Vergleich zu Kontrollfliegen zu einer Reduktion der Lebensspanne führte (Abbildung 6.3 A). Die mittlere Lebensspanne der Fliegen war um 40 % reduziert. Dabei konnte vor Eintreten des Todes keine eingeschränkte Aktivität der Fliegen beobachtet werden. Um unspezifische Effekte der RNAi-Linie GD34125 auszuschließen, wurde zusätzlich die Depletion von DCHIP mit Hilfe der RNAi-Linie HMS00986, die gegen eine andere Zielsequenz der *Dchip*-mRNA gerichtet ist, durchgeführt. Auch diese Analyse zeigte, dass die Lebensspanne der Fliegen vergleichbar signifikant reduziert war. Somit zeigten beide RNAi-Linien den gleichen lebensverkürzenden Phänotyp. Um nun einerseits Effekte des genetischen Hintergrunds als auch einen Entwicklungsdefekt als Ursache der verkürzten Lebensspanne gänzlich auszuschließen, wurde die Depletion mit der induzierbaren Treiber-Linie *Tubulin-GS* („*Geneswitch*“) durchgeführt. Diese Treiberlinie ermöglicht es Fliegen des gleichen Genotyps zu analysieren. Durch Zugabe der Substanz RU486 ins Futter konnte die Depletion von DCHIP wahlweise induziert werden. Die Depletion erfolgte hier erst ab dem adulten Stadium Tag 2. Auch die Depletion von DCHIP mit der *Tubulin-GS* Linie zeigte eine deutliche Reduktion der Lebensspanne um ca. 40 % (Abbildung 6.3 C). Demnach ist die Depletion im adulten Stadium für den lebensverkürzenden Phänotyp verantwortlich. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass DCHIP eine essentielle Rolle bei Alterungsprozessen spielen muss. Aufgrund der Tatsache, dass die Effizienz der Depletion auf Proteinebene mit der GD34125 Linie am höchsten war, wurden fortgehend alle Experimente mit dieser Linie durchgeführt, falls nicht im Text anders erwähnt.

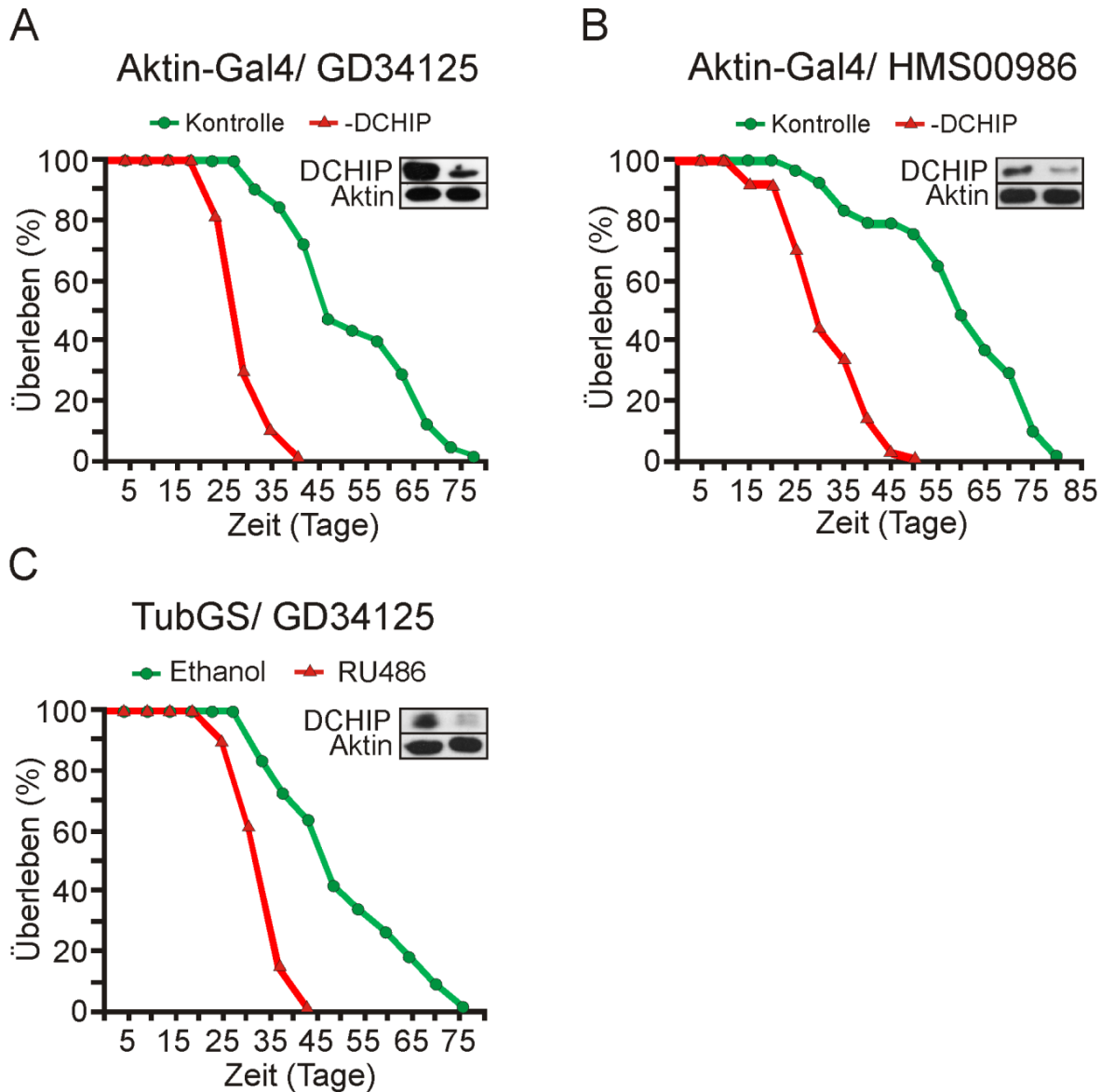


Abbildung 6.3: Ubiquitäre Depletion von DCHIP in adulten Fliegen. (A) Um DCHIP ubiquitär zu depletieren, wurden Fliegen der RNAi-Linie GD34125 mit *Aktin-Gal4* Fliegen gekreuzt. Als Kontrolle dienten Fliegen des Genotyps *Aktin-Gal4/ w¹¹¹⁸* (n=289). Die Depletion von DCHIP führte zu einer Reduktion der Lebensspanne um 40%. (n=328). (B) Die Depletion von DCHIP mit der Linie HMS00986 (n=181) führte ebenfalls zu einer verkürzten Lebensspanne der Fliegen. Als Kontrolle wurde ebenfalls *Aktin-Gal4* über *w¹¹¹⁸* Wildtyp gekreuzt. (n=175). (C) Um Effekte des genetischen Hintergrundes als Ursache der lebensverkürzenden Phänotyps auszuschließen, wurde die induzierbare Treiberlinie *Tubulin-GS* (TubGS) verwendet. Auch die induzierte Depletion von DCHIP ab adultem Stadium Tag 2 führte zu einer verkürzten Lebensspanne. Zur Induktion der Depletion wurden Fliegen auf 50 µg/ml RU486 2% Ethanol-haltigem Futter gesetzt (n=208). Als Kontrolle dienten Fliegen des gleichen Genotyps *Tubulin-GS/GD34125* auf Ethanolhaltigem Futter ohne RU486 (n=197).

6.1.4 Muskelspezifische Depletion von DCHIP

DCHIP konnte als essentielle Komponente der CASA-Maschinerie identifiziert werden (Arndt et al., 2010). Dabei vermittelt DCHIP in Assoziation mit Hsc70 und weiteren Proteinen des CASA-

Komplexes den Abbau des geschädigten Z-Scheiben Proteins Filamin und trägt somit zum Erhalt der Muskelintegrität bei. Um nun zu überprüfen, ob die DCHIP-Depletion in der Muskulatur für die Reduktion der Lebensspanne verantwortlich ist, wurde die muskelspezifische Treiberlinie *MHC-Gal4* („*myosin heavy chain*“) verwendet (Schuster et al., 1996). Diese Linie exprimiert den Gal4-Transkriptionsfaktor konstitutiv im MHC-Promoter-Muster und daher ausschließlich im Muskelgewebe. Die DCHIP-depletierten Fliegen entwickelten sich wildtypisch und es waren keine Unterschiede zur Kontrolle erkennbar. Erstaunlicherweise lebten die Fliegen, die nur noch eine eingeschränkte Expression von DCHIP im Muskel aufwiesen, vergleichbar lange wie Wildtypfliegen. Demnach konnte die eingeschränkte Expression von DCHIP in der Muskulatur als Ursache der verkürzten Lebensspanne ausgeschlossen werden.

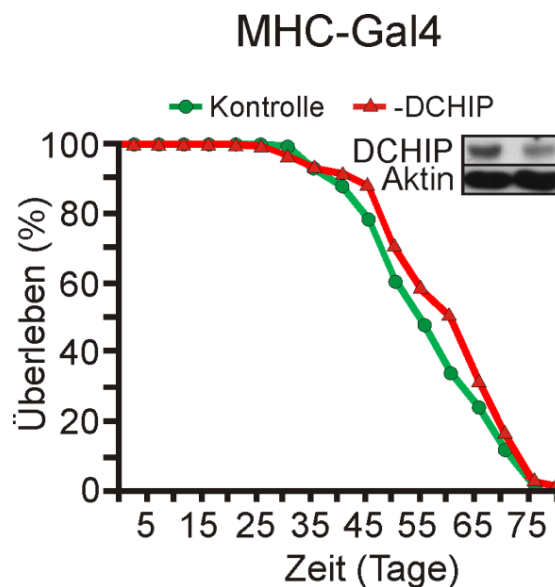


Abbildung 6.4: Muskelspezifische Depletion von DCHIP in adulten Fliegen. Um DCHIP ubiquitär zu depletieren, wurden Fliegen der RNAi-Linie GD34125 über *MHC-Gal4* gekreuzt (n=226). Als Kontrolle dienten Fliegen des Genotyps *MHC-Gal4/ w¹¹¹⁸* (n=237). Die Depletion von DCHIP führte zu keiner Reduktion der Lebensspanne.

6.1.5 DCHIP-Depletion im zentralen Nervensystem

In vorherigen Experimenten konnte eine verstärkte Expression von DCHIP im Kopf von adulten Fliegen detektiert werden, welche auf eine Funktion von DCHIP im zentralen Nervensystem hinweisen könnte (Abb. 6.2). Daher wurde eine spezifische DCHIP-Depletion im zentralen Nervensystem durch Kreuzung der Fliegenlinie *elav-GS* („*Geneswitch*“) mit der DCHIP RNAi-

Linie erzeugt. Diese Treiberlinie ermöglicht es, die Expression des RNAi-Konstrukts im Expressionsmuster des *elav*-Gens, welches im zentralen Nervensystem exprimiert ist, zu induzieren. Durch Zugabe der chemischen Substanz RU486 ins Futter, wurde ab adultem Stadium Tag 2 DCHIP spezifisch im ZNS depletiert.

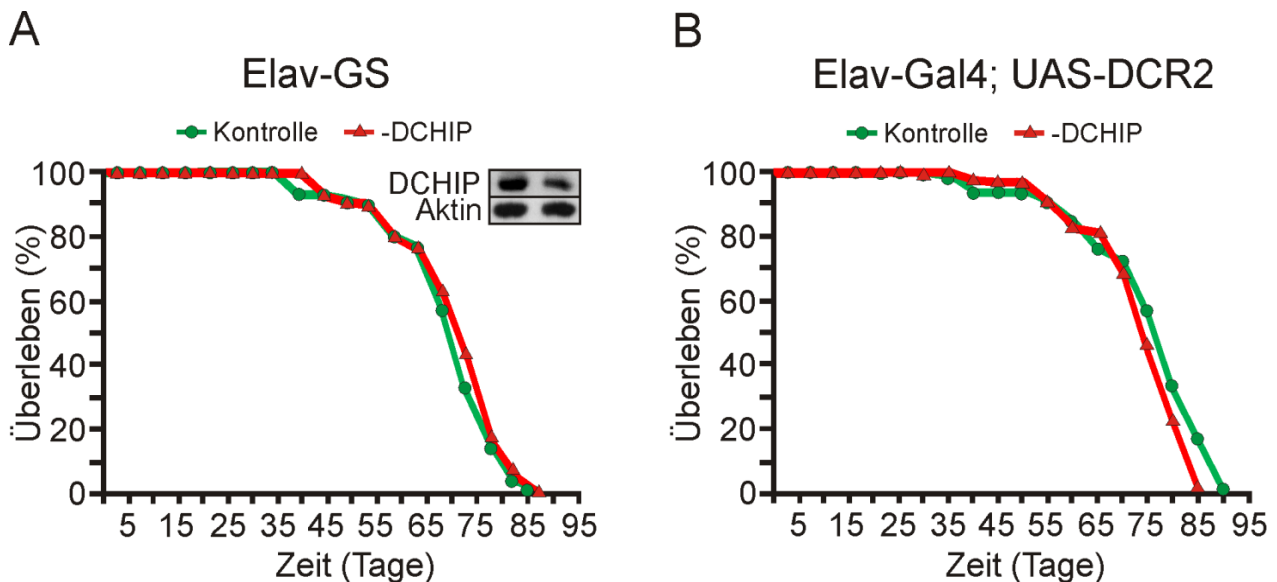


Abbildung 6.5: ZNS-spezifische Depletion von DCHIP in adulten Fliegen. (A) Um DCHIP spezifisch im zentralen Nervensystem (ZNS) zu depletieren, wurden Fliegen der RNAi-Linie GD34125 mit *elav*-GS gekreuzt und auf RU486-Futter überführt (n=195). Als Kontrolle dienten Fliegen des gleichen Genotyps auf Ethanolhaltigem Futter (n=193). Es konnte jedoch kein Effekt auf die Lebensspanne durch ZNS-spezifische Depletion von DCHIP beobachtet werden. (B) Um die Effizienz der DCHIP-Depletion im ZNS zu verbessern, wurde die RNAi Linie GD343125 mit einer konstitutiven *elav*-Treiberlinie gekreuzt, die zusätzlich den Dicer-2 co-exprimiert. *elav*-Gal4; UAS-*dcr2*/ GD34125 (n=134). Als Kontrolle dienten Fliegen des Genotyps *elav*-Gal4; UAS-*dcr2* mit Wildtyp-Fliegen *w¹¹¹⁸* gekreuzt (n=129). Es konnte aber auch hier keine Reduktion der Lebensspanne detektiert werden.

Es wurde jedoch keine phänotypische Veränderung aufgrund der DCHIP-Depletion apparent. Die Fliegen verhielten sich wildtypisch und es konnte keine kürzere Lebensspanne beobachtet werden (Abb. 6.5 A). Um die Effizienz der Depletion auf Proteinebene zu verstärken, wurde zusätzlich zur DCHIP-Depletion das Dicer-2 Protein exprimiert. Dicer-2 ist eine konstitutive Komponente der RNAi-Maschinerie und es konnte gezeigt werden, dass die Co-Expression von Dicer-2 die Effizienz der Depletion verstärkt (Dietzl et al., 2007). Dazu wurde die Fliegenlinie *elav*-Gal4; UAS-*dcr2* über die RNAi-Linie gegen DCHIP gekreuzt. Auch hier konnte keine phänotypische Veränderung festgestellt werden (Abb. 6.5 B). Die Fliegen entwickelten sich normal und es konnte keine Reduktion der Lebensspanne beobachtet werden. Daher konnte auch

das zentrale Nervensystem als Ursache des lebensverkürzenden Phänotyps ausgeschlossen werden.

6.1.6 DCHIP-Depletion im Fettkörper und Mitteldarm

Die verstärkte Expression von DCHIP im Abdomen der adulten Fliegen könnte auf eine physiologische Funktion von DCHIP in Stoffwechselorganen hindeuten. Dazu wurde zunächst DCHIP im Fettkörper und im Mitteldarm mit Hilfe der Treiberlinie *PSwitch106* depletiert. Der *Drosophila* Fettkörper ist als Ortholog der humanen Leber und des Fettgewebes anzusehen und ist somit für den Zucker-/Fettstoffwechsel sowie für die Entgiftung zuständig. Durch die Induktion der shRNA gegen DCHIP ab adultem Stadium Tag 2 konnte ein Entwicklungsdefekt ausgeschlossen werden. Es konnten keine phänotypischen Veränderungen im Vergleich zu Wildtyp Fliegen detektiert werden (Abb. 6.6 A). Jedoch konnte auch hier, ähnlich der ubiquitären Depletion von DCHIP, eine verkürzte Lebensspanne beobachtet werden. Demnach kann geschlossen werden, dass die Depletion von DCHIP in einem dieser beiden Gewebe für den lebensverkürzenden Phänotyp verantwortlich sein muss. Um dies nun eingehender zu erforschen, wurde DCHIP zunächst mit Hilfe der Treiberlinie *ppl-Gal4* (*pumpless*) spezifisch im Fettkörper depletiert. Dabei konnten keinerlei Veränderungen zu Kontrollfliegen beobachtet werden (Abb. 6.6 B). Zudem konnte eine Reduktion der Lebensspanne nicht mehr festgestellt werden. Da *ppl-Gal4* vorwiegend während der Larvenstadien verstärkt Expression induziert und über die Aktivität des Promoters im adulten Stadium der Fliegen wenig bekannt ist, wurde zusätzlich die Treiberlinie *Lsp2-Gal4* verwendet. *Lsp2-Gal4* induziert nachweislich auch im adulten Stadium Expression im Fettkörper (Lazareva et al., 2007). Jedoch war auch hier keine Reduktion der Lebensspanne durch Expression der DCHIP shRNA im *Lsp2*-Muster detektierbar (Abb. 6.6 C). Demnach scheint der Mitteldarm das Gewebe zu sein, in dem die DCHIP-Funktion essentiell für einen gesunden Alterungsprozess ist. Um dies nun zu verifizieren, wurde DCHIP mit der Treiberlinie *TIGS-2* depletiert. *TIGS-2* ist eine Treiberlinie, die nur in bestimmten Bereichen des Mitteldarms Expression induziert. Durch die Induktion von shRNA gegen DCHIP im Mitteldarm konnte die reduzierte Lebensspanne wieder beobachtet werden (Abb. 6.6 D). Dies lässt nun den Schluss zu, dass DCHIP-Funktion im Mitteldarm essentiell für den Erhalt der Proteostase während des Alterungsprozesses ist und dass eine reduzierte Expression von DCHIP zu einer verkürzten Lebensspanne der Fliegen führt.

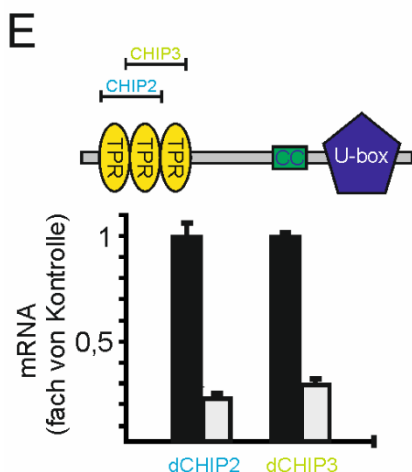
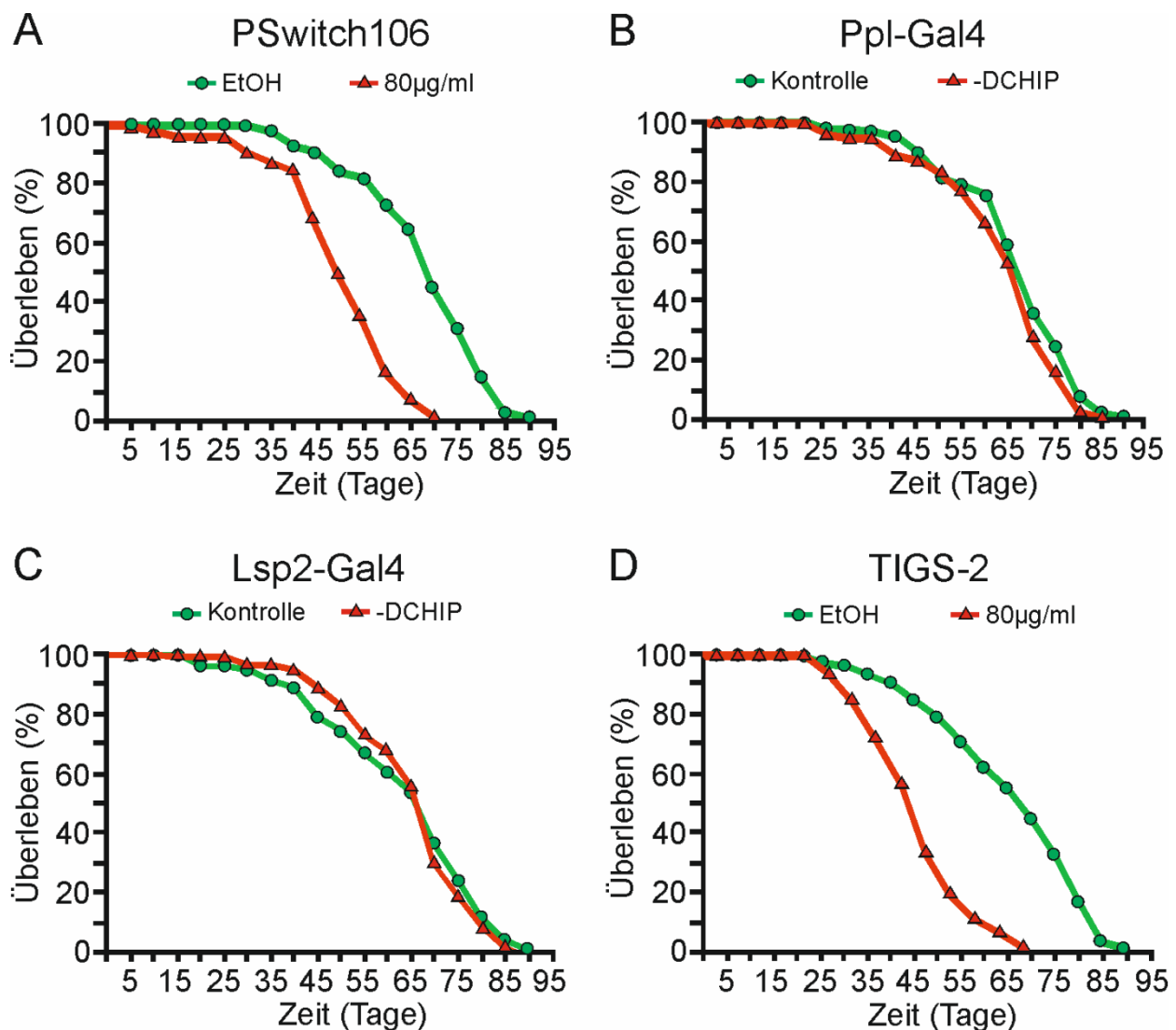


Abbildung 6.6: Mitteldarm-spezifische Depletion von DCHIP in adulten Fliegen ist für den lebensverkürzenden Phänotyp verantwortlich. Um DCHIP spezifisch in Stoffwechselorganen zu depletieren, wurden Fliegen der RNAi-Linie GD34125 gegen DCHIP über *ppl*-Gal4, *Lsp2*-Gal4, *PSwitch106* und *TIGS-2* gekreuzt. Als Kontrolle dienten Fliegen des Genotyps *ppl*-Gal4/*w*¹¹¹⁸ (n=181), *Lsp2*-Gal4 (n=179) bzw. *PSwitch106*/GD34125 (n=215); *TIGS-2*/GD34125 (n=179) auf EtOH- haltigem Kontrollfutter ohne RU486. Wildtyp-Fliegen auf RU486-haltigem Futter zeigten keine phänotypische Veränderung (Daten nicht gezeigt). Depletion von DCHIP im Fettkörper mit der Treiberlinie *ppl*-Gal 4 (n=194) und *Lsp2*-Gal4 (n=181) führte zu keiner Reduktion der Lebensspanne, während

hingegen die Depletion mit dem Treiber *PSwitch106* (n=193), welcher sowohl im Fettkörper als auch im Mitteldarm Expression induziert, eine verkürzte Lebensspanne zu beobachten war. Die Mitteldarm-spezifische Depletion mit Hilfe der *TIGS-2* Linie (n=181) zeigte eine signifikante Reduktion der Lebensspanne. Demnach ist die Depletion von DCHIP im Mitteldarm verantwortlich für den lebensverkürzenden Phänotyp.

6.2 Proteinbiochemische Analyse der CHIP-Funktion in Säugerzellen

Da in *Drosophila* die Analyse proteinbiochemischer Mechanismen unter anderem aufgrund mangelnder Antikörper und der langen Generationszeiten erschwert ist, wurden weitere Experimente hinsichtlich der Ursache der verkürzten Lebensspanne der Fliegen in Säugerzellen durchgeführt.

6.2.1 CHIP vermittelt den Abbau von phosphoryliertem AKT

CHIP assoziiert mit der zentralen Kinase des Insulinsignalwegs AKT in Säugerzellen (Dickey et al., 2008; Su et al., 2011). Aus diesem Grund sollte zunächst untersucht werden, welchen Einfluss CHIP in humanen HEK293-Zellen auf die AKT Expression hat. Dazu wurde CHIP mit Hilfe von siRNA transient in HEK293-Zellen depletiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass in Abwesenheit von CHIP die Proteinmenge von phosphoryliertem AKT signifikant erhöht war, wohingegen die Expression von nicht-phosphoryliertem AKT unverändert blieb (Abb. 6.7). Somit reguliert CHIP die Aktivität von AKT und indirekt die des Insulinsignalwegs (IIS), jedoch nicht den AKT-Abbau an sich.

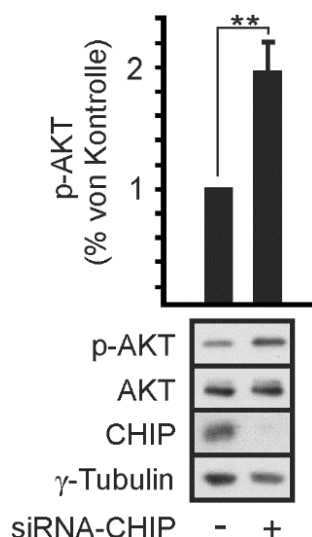


Abbildung 6.7: Depletion von CHIP stabilisiert p-AKT. Die CHIP spezifische Depletion durch transiente Transfektion von siRNA in HEK293-Zellen (48h) führte zu einer signifikanten Stabilisierung von phosphoryliertem AKT. Die Proteinmenge von nicht-phosphoryliertem AKT blieb hingegen vergleichbar zur Kontrolle (Allstars siRNA). Es wurden jeweils 40 µg Protein geladen. Die Balken stellen die Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen dar. Fehlerbalken beziehen sich auf den Standardfehler der Mittelwerte (SEM). Sterne weisen auf die mathematische Signifikanz nach dem ANOVA-Test hin.

6.2.2 Depletion von CHIP führt zur verstärkten Aktivierung des Insulin Signalwegs

CHIP ubiquitiniert p-AKT und CHIP Depletion führt zur erhöhten p-AKT Proteinmenge (Su et al., 2011; Abbildung 6.7). Um nun weitere Auswirkungen der CHIP-Depletion auf den Insulinsignalweg zu untersuchen, wurden weitere Komponenten dieses Signalweges im Western-Blot analysiert. Es konnte eine Aktivierung der oberhalb von AKT stehenden Kinase in der Signalkaskade festgestellt werden. Während sich die Depletion von CHIP nicht auf die PDK1 Proteinmenge auswirkte, konnte eine verstärkte Phosphorylierung und somit Aktivivierung von PDK1 beobachtet werden. Demnach ist CHIP nicht für den Abbau von PDK1 im „*steady state*“, sondern für die Aktivierung von PDK1 oder einer weiter oben stehenden Komponente verantwortlich, die PDK1 innerhalb des Insulinsignalwegs aktiviert.

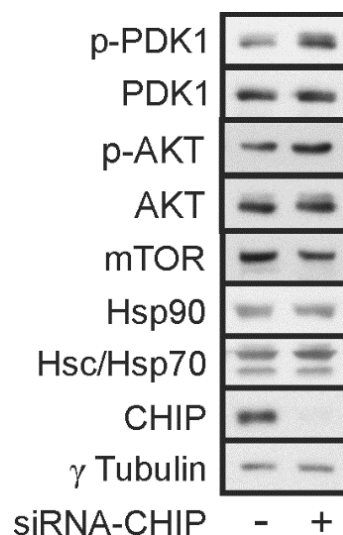


Abbildung 6.8: Depletion von CHIP stabilisiert p-PDK1. HEK293-Zellen wurden mit siRNA gegen CHIP transient transfiziert und 48 h nach Transfektion wurden die Proteinmengen mit spezifischen Antikörpern im Western-Blot analysiert. Es wurden jeweils 40 µg Protein geladen. Die CHIP spezifische Depletion führte zur Stabilisierung der phosphorylierten PDK1-Kinase, welche in der Signalkaskade des Insulinsignalwegs oberhalb von AKT steht. Demnach führt die Depletion von CHIP zur Aktivierung des IIS unabhängig von AKT und die AKT-Aktivierung ist möglicherweise durch p-PDK1 vermittelt.

6.2.3 Depletion von CHIP führt zur Stabilisierung des Insulinrezeptors

Bislang konnten diverse Substratproteine von CHIP identifiziert werden. Darunter auch membranständige Rezeptorproteine wie der ErbB2- (Xu et al., 2002) und der GHR-Rezeptor

(Slotman et al., 2012). Demnach könnte der Insulinrezeptor (INSR) selbst das CHIP-Substrat sein, welches PDK1 und weiter untenstehende Komponenten des Insulinsignalwegs beeinflusst. Daher wurde in CHIP-depletierten HEK293-Zellen das Expressionsniveau der Beta-Untereinheit des Insulinrezeptors im Western-Blot überprüft. Eine Reduzierung der CHIP-Proteinmenge führte zu einer signifikanten Stabilisierung des INSR auf Proteinebene (Abbildung 6.9). Um nun eine verstärkte Expression des INSR-Transkripts als Ursache für die verstärkte Detektion des Rezeptors auf Proteinebene auszuschließen, wurde eine qPCR durchgeführt. Dabei konnte deutlich gezeigt werden, dass die Transkriptmenge des INSR in CHIP-depletierten Zellen unverändert war (Abb. 6.9). Das lässt den Schluss zu, dass der INSR ein Substrat des CHIP-vermittelten Abbaus ist.

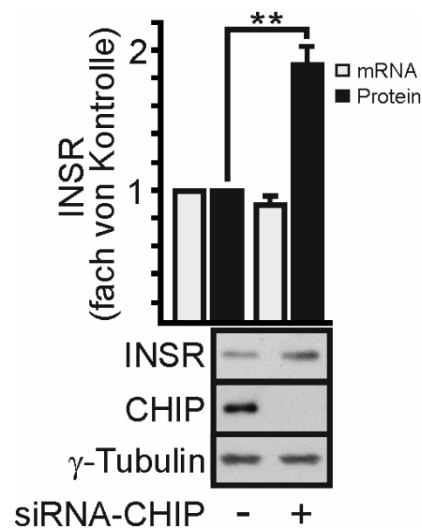


Abbildung 6.9: Depletion von CHIP stabilisiert den Insulinrezeptor. Die transiente Depletion von CHIP in HEK293-Zellen führte zur Stabilisierung des INSR-Proteins. Es wurden pro Ansatz 40 μ g Protein im Western-Blot geladen. Die Transkriptmenge des Insulinrezeptors jedoch war unverändert im Vergleich zur Kontrolle. Für die qPCR wurden jeweils 500 ng RNA in cDNA umgeschrieben und in der qPCR eingesetzt. Die Balken stellen die Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen dar. Fehlerbalken beziehen sich auf den Standardfehler der Mittelwerte (SEM). Sterne weisen auf die mathematische Signifikanz nach dem ANOVA-Test hin.

6.2.4 CHIP stimuliert den Abbau des Insulinrezeptors

In Abschnitt 6.2.3 konnte gezeigt werden, dass die Depletion von CHIP in HEK293-Zellen zu einer Stabilisierung des INSR auf Proteinebene führte. Wenn nun CHIP für den Abbau des Rezeptors verantwortlich ist, könnte eine verstärkte Expression von CHIP den gegenteiligen Effekt zeigen und somit eine deutliche Reduzierung der Rezeptormenge zur Folge haben. Dazu

wurden HEK293-Zellen transient mit CHIP cDNA unter der Kontrolle des CMV-Promoters transfiziert. Die Überexpression von CHIP führte zu einer signifikanten Reduzierung des INSR-Proteins. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte der INSR als neues CHIP-Substrat identifiziert werden.

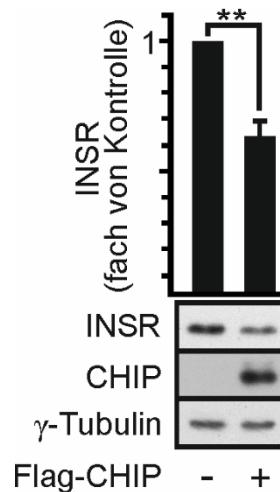


Abbildung 6.10: CHIP-Überexpression führt zu Abnahme der Insulinrezeptor Proteinmenge. Die transiente Expression von CHIP in HEK293-Zellen (48h) unter der Kontrolle des CMV-Promoters führte zu einer signifikanten Reduktion des INSR im Western-Blot. Es wurden 40 µg Protein pro Probe geladen. Die Balken stellen die Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen dar. Fehlerbalken beziehen sich auf den Standardfehler der Mittelwerte (SEM). Sterne weisen auf die mathematische Signifikanz nach dem ANOVA-Test hin.

6.2.5 CHIP assoziiert mit dem Insulinrezeptor *in-vivo*

CHIP vermittelt den Abbau des Insulinrezeptors (Abschnitt 6.2.4). Um zu überprüfen, ob CHIP mit dem Insulinrezeptor *in-vivo* interagiert, wurden Immunpräzipitationen durchgeführt. Dazu wurde sowohl CHIP als auch der INSR aus HEK293-Zellen in unterschiedlichen Ansätzen mit spezifischen Antikörpern präzipitiert. Die weiterführende Analyse erfolgte schließlich mittels Western-Blot. Zunächst konnte endogen keine Assoziation der beiden Proteine nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). In Überexpression beider Proteine und gleichzeitiger Behandlung der Zellen mit dem lysosomalen Inhibitor Chloroquin konnte eine Interaktion von CHIP und dem INSR nachgewiesen werden, jedoch nur in der INSR-spezifischen Präzipitation. Dies ist wohl durch die transiente Natur der Interaktion zu erklären. Demnach interagieren CHIP und der INSR *in-vivo*. Desweiteren kann vermutet werden, dass CHIP den INSR über einen lysosomalen Weg abbaut, da bei Behandlung der Zellen mit dem proteasomalen Inhibitor MG132 und

gleichzeitiger Überexpression beider Komponenten keine Interaktion nachweisbar war (Daten nicht gezeigt).

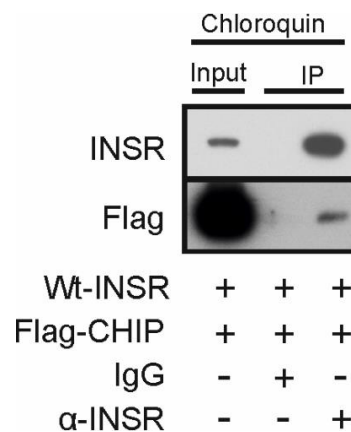
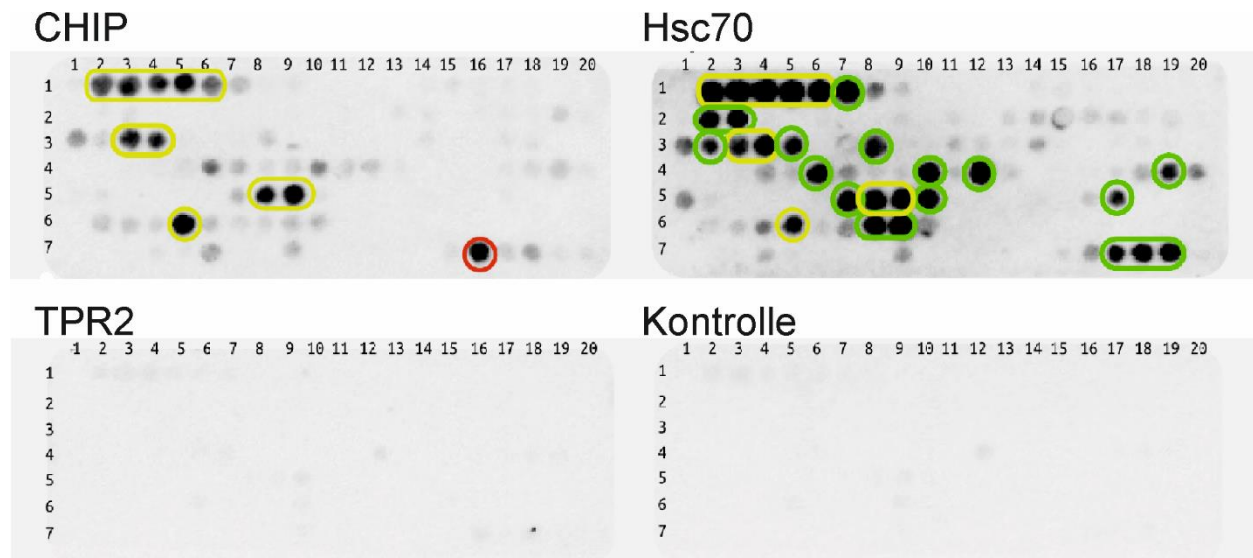


Abbildung 6.11: CHIP interagiert mit dem Insulinrezeptor *in-vivo*. HEK293-Zellen wurden mit pCMV-CHIP und pRT3-wt-INSR transfiziert und über Nacht (16h) mit dem lysosomalen Inhibitor Chloroquin (100 μ M) behandelt. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und eine Immunpräzipitation durchgeführt. Mit der INSR-spezifischen Immunpräzipitation konnte eine Interaktion des Insulinrezeptors mit CHIP im Western-Blot nachgewiesen werden.

6.2.6 Identifikation der CHIP und Hsc70-Bindemotive im Insulinrezeptor

Zur Identifikation der Bindestellen im Insulinrezeptor, die für die CHIP und Hsc70 Bindung verantwortlich sind, wurde ein sogenannter „peptide array“ durchgeführt. Dazu wurden aus der Sequenz der Beta-Untereinheit des INSR 140 kleine 13 Aminosäuren-lange sich überlappende Peptide synthetisiert. Diese bestehen aus den Aminosäuren 960-1382 der Beta-Untereinheit des INSR und umfassen die zytoplasmatische Kinasedomäne und Teile der Transmembrandomäne. Diese Peptide wurden auf einer Nitrozellulose-Membran immobilisiert und anschließend mit aufgereinigtem Protein inkubiert. Die anschließende Detektion erfolgte im Western-Blot. Da CHIP überwiegend in Kooperation mit Hsc70 Proteinabbau reguliert, lag es nahe Hsc70 in dieses Experiment mit einzubinden. Desweiteren wurde TPR2, ein weiteres Hsc70-Cochaperon, welches den INSR auf Proteinebene reguliert (Daten nicht gezeigt), in den Versuch integriert. Es konnten 28 Bindestellen für Hsc70 und 11 Bindestellen für CHIP identifiziert werden. Davon wurden 10 sowohl von CHIP als auch von Hsc70 erkannt, während 18 Bindestellen nur von Hsc70 und nur eine einzige Bindestelle ausschließlich von CHIP erkannt wurde. Es handelt sich bei den Bindemotiven weitestgehend um hydrophobe Sequenzmotive, die charakteristisch für Chaperonbindung sind. Aufgrund der sich überlappenden Peptidsequenzen ist die Zahl der realen

Bindestellen im Protein deutlich geringer einzuschätzen. TPR2 war nicht in der Lage direkt an eine Peptidsequenz des INSR zu binden. Dementsprechend kann man für TPR2 eine direkte Interaktion mit dem INSR ausschließen und zusätzlich verdeutlicht es die Spezifität der Bindung von CHIP und Hsc70 an den INSR in diesem Experiment.



Nr.	Sequenz	CHIP	Hsc70	CHIP +Hsc70	Nr.	Sequenz	CHIP	Hsc70	CHIP +Hsc70
1	GPLIFVFLFSVVI			X	16	NCMVAHDFTVKIG		X	
2	IFVFLFSVIGSI			X	17	DFTVKIGDFGMTR		X	
3	FLFSVIGSIYLF			X	18	RKGGKGLLPVRWM		X	
4	SVVIGSIYLFRLK			X	19	TSSDMWSFGVVLW		X	
5	IGSIYLFRLKRQP			X	20	DMWSFGVVLWEIT			X
6	IYLFRLKRQPDGP		X		21	SFGVVLWEITSLA			X
7	REKITLLRELQQG		X		22	VVLWEITSLAEQP		X	
8	ITLLRELQGQSGF		X		23	VLKFVMDGGYLDQ		X	
9	VMKGFTCHHVRL				24	MRMCWQFNPKMRP			X
10	GFTCHHVRLRGV		X		25	KMRPTFLEIVNLL		X	
11	CHHVRLRGVVSK			X	26	PTFLEIVNLLKDD		X	
12	VVRLRGVVSKGQP			X	27	THMNGGKKNRIL	X		
13	LLGVVSKGQPTLV		X		28	NGGKKNRILTLP		X	
14	PTLVVMEIHAHGD		X		29	KKNRILTLPASN		X	
15	AKKFVHRDLAARN		X		30	NRILTLPASNPS		X	

Abbildung 6.12: Identifikation der Bindestellen von CHIP und Hsc70 im Insulinrezeptor. Anhand der Sequenz des humanen INSR wurde aus der zytoplasmatischen Domäne und Teilen der Transmembrandomäne 140 sich überlappende 13-mer grosse Peptide synthetisiert. Diese Peptide wurden auf einer Nitrozellulose-Membran immobilisiert und anschließend mit aufgereinigtem Protein inkubiert. Unter den 18 Peptiden die ausschließlich von Hsc70 und den 10 Peptiden die sowohl von Hsc70 als auch von CHIP erkannt wurden, sind für Peptid 7 (grün) und Peptid 21 (gelb) Mutationen im Menschen bekannt, die mit Diabetes assoziiert sind. Über die Bindestelle, die vorzugsweise von CHIP erkannt wird (rot), ist nichts weiter bekannt.

6.2.7 CHIP ubiquitiniert den INSR *in-vitro*

CHIP vermittelt im Zuge der peripheren Proteinqualitätskontrolle den Abbau von fehlgefaltetem CFTR („*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*“) an der Plasmamembran durch Ubiquitinierung und anschließender Internalisierung durch Endozytose (Okiyoned et al., 2010). Aufgrund der Assoziation von CHIP mit dem INSR *in-vivo* sollte untersucht werden, ob CHIP den INSR *in-vitro* ubiquitinieren kann. Dazu wurde ein Teil des humanen Insulinrezeptors, der Aminosäuren 980-1382 (CD220, HFF5) des INSR entspricht, in einen pMal-Vektor mit einem MBP-Tag kloniert. Anschließend wurde eine *in-vitro*-Ubiquitinierung mit aufgereinigtem MBP-getaggtm INSR in Abwesenheit von und mit Hsc70 durchgeführt. Dabei konnte beobachtet werden, dass CHIP allein in der Lage war den INSR zu ubiquitinieren. Dies geht einher mit der Tatsache, dass CHIP ohne Hsc70 direkt an den INSR binden kann (Abschnitt 6.2.6). Auffällig war dabei, dass der INSR vorwiegend monoubiquitiniert wurde. Die Ubiquitinierung des INSR wurde durch Anwesenheit von Hsc70 signifikant verstärkt.

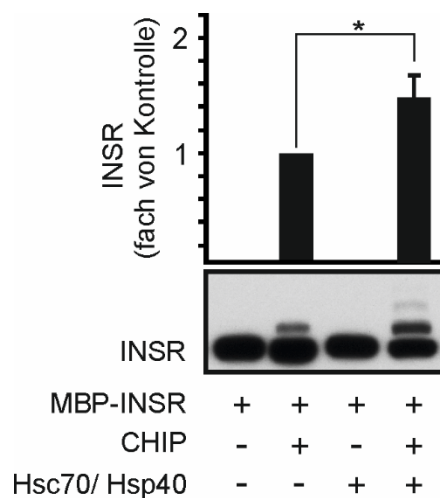


Abbildung 6.13: *in-vitro*-Ubiquitinierung des Insulinrezeptors. Aufgereinigter MBP-getaggtter INSR wurde zusammen mit CHIP und Hsc70 in einer Ubiquitinierungsreaktion eingesetzt. Die Reaktion erfolgte bei 30°C für 1 h. Es wurden folgende Proteinkonzentrationen verwendet: 20 µM Ubiquitin, 0,1 µM E1 (Weizen); 2 µM UbcH5b (E2); 2 µM CHIP; 2µM Hsc70; 0,2 µM Hsp40. Die Ubiquitinierung wurde mit spezifischem Antikörper gegen den humanen INSR im Western-Blot analysiert. Als Negativkontrolle dienten Proben jeweils ohne CHIP und Hsc70. Fehlerbalken beziehen sich auf den Standardfehler der Mittelwerte (SEM). Sterne weisen auf die mathematische Signifikanz nach dem ANOVA-Test hin.

6.2.8 Identifikation der ubiquitinierten Lysinreste im INSR mittels Massenspektrometrie

CHIP ubiquitiniert den INSR *in-vitro* (Abschnitt 6.2.7). Um nun die Lysine des INSR zu identifizieren, die durch CHIP ubiquitiniert werden, wurde eine *in-vitro*-Ubiquitinierung auf ein SDS-Gel aufgetragen und mit kolloider Coomassie Lösung gefärbt. Anschließend wurden Banden, die ubiquitinierten INSR darstellten, ausgeschnitten und einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen. In der Probe auf Höhe des monoubiquitinierten INSR konnte lediglich ein Lysinrest an der Aminosäureposition 1047 (K1047) des humanen INSR identifiziert werden, der CHIP abhängig ubiquitiniert wurde. In der zweiten Probe mit höhermolekularem polyubiquitinierten INSR konnte ein zusätzlicher Lysinrest an Position 1057 (K1057) identifiziert werden. Dies deutet auf eine hohe Spezifität der *in-vitro*-Ubiquitinierungsreaktion hin, da noch zahlreiche potentielle Lysine innerhalb der Proteinsequenz vorhanden sind.

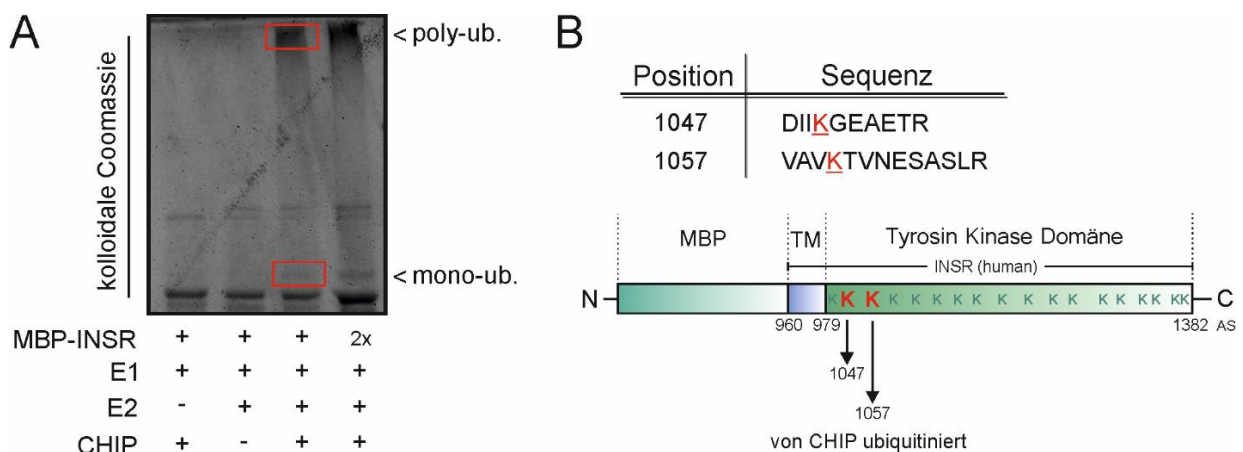


Abbildung 6.14 Massenspektrometrische Analyse der durch CHIP ubiquitinierten Lysine im INSR. Aufgereinigter MBP-getaggtter INSR wurde zusammen mit CHIP in einer Ubiquitinierungsreaktion eingesetzt. Die Reaktion erfolgte wie in Abschnitt 6.2.7 beschrieben. Als Negativkontrolle dienten Proben ohne E2 und ohne CHIP. **A.** Die Ubiquitinierung wurde über eine SDS-PAGE aufgetrennt und mit kolloider Coomassie-Lösung angefärbt. Die rotmarkierten Banden wurden ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert. **B.** Schematische Darstellung der durch Massenspektrometrie identifizierten Lysinreste K1047 und K1057 im INSR, die CHIP abhängig ubiquitiniert wurden.

6.2.9 Bioinformatische Analyse zeigt Lysin K1047 liegt in unmittelbarer Nähe der CHIP- und Hsc70-Bindestellen im INSR

Die Kristallstruktur der Tyrosin-Kinasedomäne des humanen Insulinrezeptors konnte verifiziert werden (Hubbard et al., 1994). Sie ermöglicht eine detaillierte Analyse der Hsc70-/CHIP-

Bindestellen in der dreidimensionalen Struktur des INSR-Proteins in Relation zu den Lysinresten, welche CHIP-abhängig ubiquitiniert werden (Abschnitt 6.2.8). Aufgrund der Tatsache, dass das Lysin K1057 in der gefalteten Proteinstruktur unzugänglich erscheint, wurden die CHIP- und Hsc70-Bindestellen in Bezug auf das freiliegende Lysin K1047 betrachtet. Es konnten zwei Bindestellen in unmittelbarer Nähe des Lysins K1047 identifiziert werden. Die Punktmutationen R1020Q und W1227S innerhalb dieser Bindestellen sind bei Patienten beschrieben, die aufgrund dieser Mutationen unter Diabetes leiden (Moller et al., 1990; Kusari et al., 1991). Die CHIP-Bindestelle am C-Terminus konnte dabei nicht genau lokalisiert werden, da die Kristallstruktur der Kinasedomäne des INSR diese nicht abdeckt. Da die CHIP-Bindestelle auf Sequenzebene deutlich von der sich überlappenden Bindestelle entfernt liegt, lässt dies auch keinen Schluss auf die Position der Bindestelle zu K1047 innerhalb des INSR zu.

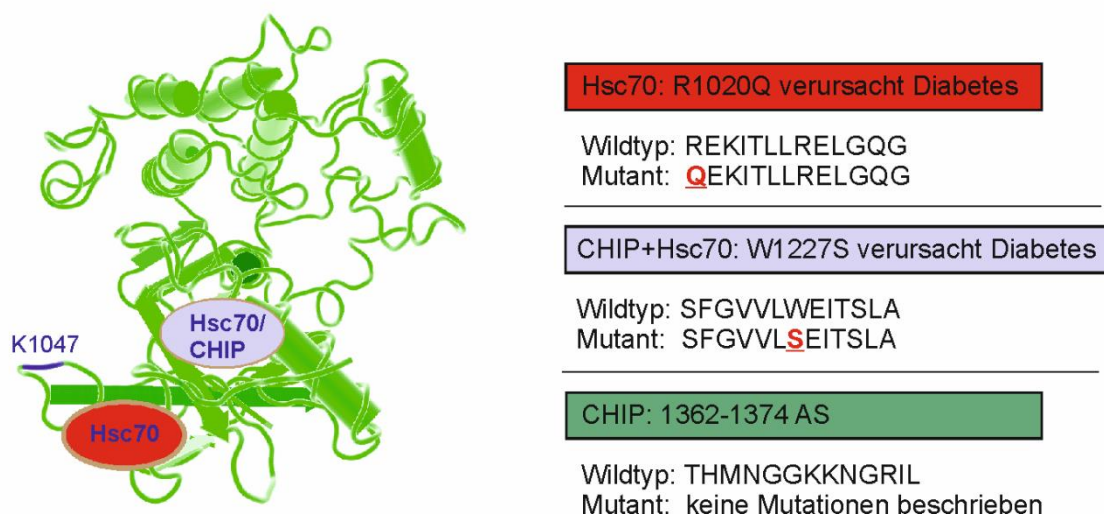


Abbildung 6.15: Analyse der durch CHIP ubiquitinierten Lysine im INSR mit Hilfe der Kristallstruktur der Kinasedomäne. Es konnten 2 Bindestellen in unmittelbarer Nähe zu dem freiliegenden K1047 mit Hilfe der Kristallstruktur der Kinasedomäne des INSR identifiziert werden. Für beide Bindestellen sind Mutationen in Patienten beschrieben, die zu Diabetes führen. Für die CHIP-Bindestelle sind bislang keine Mutationen beschrieben.

6.2.10 Der INSR wird *in-vivo* monoubiquitiniert

Wie in Abschnitt 6.2.7 gezeigt, wurde der INSR *in-vitro* vorwiegend monoubiquitiniert. Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs) wie der EGF- und der PDGF-Rezeptor werden nach Hormonstimulation monoubiquitiniert und über Endozytose internalisiert. Dabei konnte gezeigt

werden, dass die Monoubiquitinierung als Internalisierungssignal für die Endozytose essentiell ist (Polo et al., 2002). Zum Nachweis, dass der INSR in Zellen monoubiquitiniert vorliegt, wurden HEK293-Zellen mit dem Endozytose-Inhibitor V34-2 („*dynamin inhibitor V, 34-2*“) behandelt. Der Inhibitor V 34-2 ist ein optimiertes „Dynasore“ Analog, welches nachweisbar eine stärkere Inhibition von Dynamin I und II vorweist als Dynasore selbst (Chircop et al. 2011; Hill et al. 2009). Zudem sollte Endozytose direkt an der Plasmamembran inhibiert werden, da in diesem frühen Stadium der Endozytose eine Monoubiquitinierung durch Insulin-Stimulation des INSR zu erwarten war. Dazu wurden die Zellen zusätzlich mit Insulin behandelt. Anschließend erfolgte eine Immunpräzipitation mit einem INSR-spezifischen Antikörper.

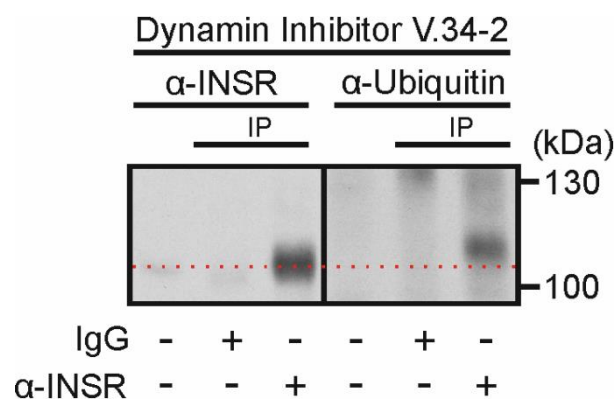


Abbildung 6.16: Analyse des Ubiquitinierungsmusters des INSR in HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden mit Insulin und dem Dynamin-Inhibitor V.34-2 behandelt und anschließend erfolgte eine Immunpräzipitation mit einem INSR-spezifischen Antikörper. Es konnte mit einem gegen Ubiquitin-gerichteten Antikörper eine Bande detektiert werden, die um ein Ubiquitinmolekül größer war als der unmodifizierte INSR. In der IgG-Kontrollprobe konnten beide Banden nicht detektiert werden.

Es konnte mit einem gegen Ubiquitin-gerichteten Antikörper eine Größenveränderung von ca. einem Ubiquitinmolekül (8,5 kDa) detektiert werden. Polyubiquitinerter INSR war nur schwach erkennbar. Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass der INSR *in-vivo* monoubiquitiniert vorliegt.

6.2.11 Der INSR wird über einen lysosomalen Weg abgebaut

Zur Verifikation des Abbauwegs, welcher für den INSR vorliegt, wurden HEK293-Zellen mit unterschiedlichen Inhibitoren behandelt und die Proteinmenge im Western-Blot analysiert. Die Behandlung der Zellen mit dem proteasomalen Inhibitor MG132 hatte keine Stabilisierung des

INSR auf Proteinebene zur Folge. Die CHIP-Proteinmenge blieb ebenso unverändert. Demnach konnte das Ubiquitin-Proteasom-System („UPS“) als Abbauweg für den INSR ausgeschlossen werden. Eine Inhibition des lysosomalen Abbauwegs durch Bafilomycin A1, welches die V-ATPase inhibiert und somit sowohl die Ansäuerung des Vesikels als auch die Autophagosom-Lysosom Fusion verhindert, hatte eine signifikante Stabilisierung des INSR zur Folge. Ein ähnliches Bild ergab die Inhibition mit Chloroquin, das als Base ebenfalls die Ansäuerung des Lysosoms verhindert. Zellen, die mit dem Endozytose-Inhibitor V.34-2 behandelt wurden, zeigten ebenfalls eine signifikante Stabilisierung des INSR im Vergleich zur Kontrolle. Auffallend war ebenso eine deutliche Zunahme der CHIP-Proteinmenge durch Behandlung mit den Inhibitoren.

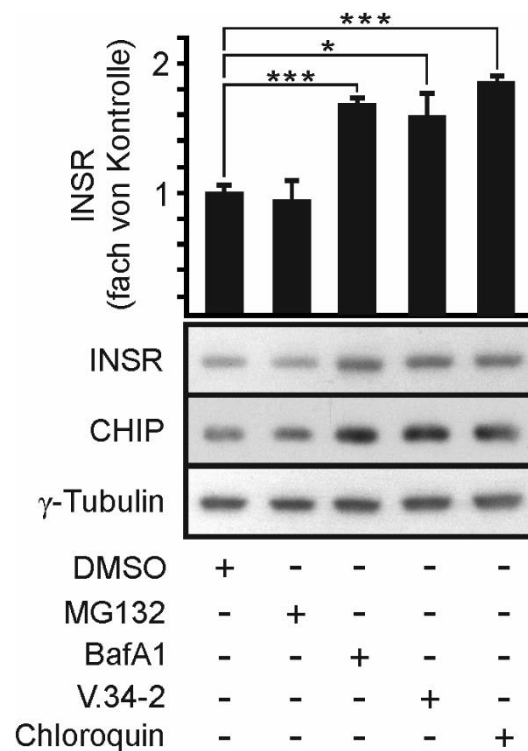


Abbildung 6.17: Der INSR wird über einen autophagisch-lysosomalen Weg abgebaut. HEK293-Zellen wurden mit unterschiedlichen Inhibitoren behandelt (16h) um den Mechanismus des INSR-Proteinabbaus zu untersuchen. Während die Behandlung der Zellen mit dem proteasomalen Inhibitor MG132 keinen Einfluss auf die INSR Proteinmenge zeigte, hatte die Behandlung mit den autophagisch-lysosomalen Inhibitoren Bafilomycin, Chloroquin und dem Dynamin-Inhibitor V34-2 eine signifikante Stabilisierung der INSR-Proteinmenge zur Folge. Demnach wird der INSR über einen autophagisch-lysosomalen Weg abgebaut. Es wurden jeweils 40 µg Protein aufgetragen. Die Balken stellen die Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen dar. Fehlerbalken beziehen sich auf den Standardfehler der Mittelwerte (SEM). Sterne weisen auf die mathematische Signifikanz nach dem ANOVA-Test hin.

Demnach kann abschließend gesagt werden, dass der INSR in HEK293-Zellen über den autophagisch-lysosomalen Weg abgebaut wird und dass CHIP ebenfalls über den autophagisch-lysosomalen Weg reguliert wird.

6.2.12 Der INSR wird nicht über Autophagie abgebaut

Als nächstes wurde eine Depletion der essentiellen Autophagie-Komponente ATG7 mit siRNA in HEK293-Zellen durchgeführt. Die Depletion von ATG7 führte zu einer verminderten Lipidierung des Mikrotubuli-assoziierten Proteins LC3, welches für die Assemblierung der phagophoren Membran notwendig ist und welches als Maß für Autophagie verwendet wird (Mizushima und Yoshimori, 2007; Klionsky, 2012). Zusätzlich war eine Stabilisierung des selektiven Autophagie-Adapters p62 detektierbar. Demnach führte die ATG7-Depletion zu einem reduzierten autophagischen Abbau. Eine Veränderung der INSR-Proteinmenge konnte jedoch nicht festgestellt werden. Demzufolge wird der INSR in HEK293-Zellen unter Standardbedingungen nicht über einen autophagischen Weg abgebaut.

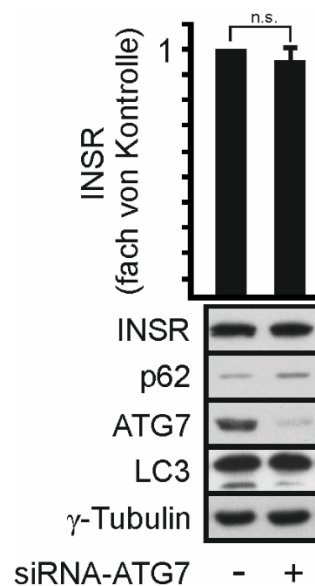


Abbildung 6.18: ATG7 Depletion in HEK293-Zellen hat keine Auswirkung auf die INSR-Proteinmenge. Die Depletion des E1 Enzyms ATG7, welches essentiell für den autophagischen Abbau ist, zeigte eine Stabilisierung von p62. Zusätzlich war eine verminderte Lipidierung von LC-3 I zur kleineren prozessierten Form LC-3 II nachweisbar. Demnach wurde durch ATG7-Depletion Autophagie gehemmt. Eine Veränderung der INSR-Proteinmenge konnte jedoch nicht beobachtet werden. Demnach wird der INSR nicht über Autophagie abgebaut. Es wurden jeweils 40 µg Protein geladen. Die Balken stellen die Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen dar. Fehlerbalken beziehen sich auf den Standardfehler der Mittelwerte (SEM). Sterne weisen auf die mathematische Signifikanz nach dem ANOVA-Test hin.

6.2.13 CHIP vermittelt den Abbau des INSR über Endozytose

Der INSR wird über Endozytose internalisiert und abgebaut (Gavin et al., 1974; Green und Olefsky, 1982; Ceresa et al., 1998). Daher sollte untersucht werden, welche Rolle CHIP beim Abbau des INSR durch Endozytose spielt. CHIP wurde in HEK293-Zellen transient überexprimiert und anschließend wurden die Zellen mit dem Endozytose-Inhibitor V.34-2 behandelt. Die Überexpression bestätigte wie in Kapitel 6.2.4 beschrieben eine signifikante Abnahme der INSR-Proteinmenge. Bei Überexpression von CHIP und gleichzeitiger Behandlung mit V.34-2 konnte der CHIP-induzierte Abbau vollständig blockiert werden. Demnach kann man schließen, dass CHIP einen Abbau des INSR durch Endozytose induziert.

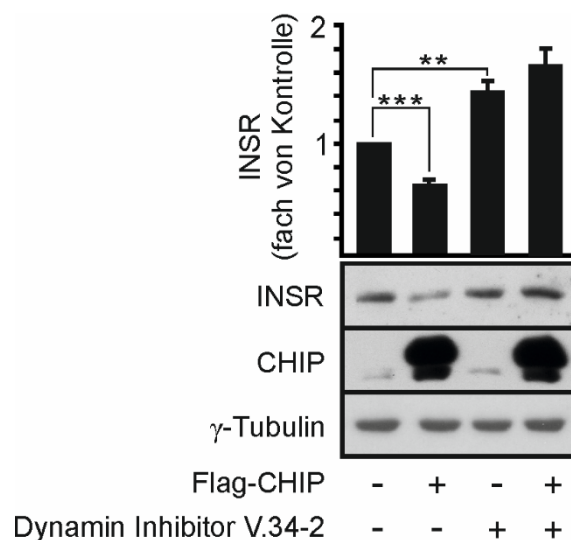


Abbildung 6.19: Inhibition von Endozytose verhindert CHIP-vermittelten Abbau des INSR. HEK293-Zellen wurden transient mit pCMV-tag2B und pCMV-CHIP transfiziert (48h) und anschließend mit dem Inhibitor V.34-2 behandelt (10 μ M, 20 h). Die Behandlung der Zellen mit V.34-2 verhinderte den CHIP-vermittelten Abbau des INSR. Pro Ansatz wurden 40 μ g Protein eingesetzt. Die Balken stellen die Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen dar. Fehlerbalken beziehen sich auf den Standardfehler der Mittelwerte (SEM). Sterne weisen auf die mathematische Signifikanz nach dem ANOVA-Test hin.

6.2.14 Lysin K1047 ist essentiell für den Abbau des INSR

Das in Kapitel 6.2.8 mittels Massenspektrometrie identifizierte Lysin K1047 im INSR, welches durch CHIP ubiquitiniert wurde, konnte durch gezielten Aminosäureaustausch durch ein Arginin (R) ersetzt werden. Die Expression erfolgte im pCMV-Vektor in HEK293-Zellen. Im Vergleich

zur wildtypischen INSR-Expression zeigte die K1047R-Mutante eine deutlich höhere Stabilität. Durch Inhibition des autophagisch-lysosomalen Abbaus durch Chloroquinbehandlung konnte die Proteinmenge von wildtypischem INSR an die K1047R-Mutante angeglichen werden. Dies verdeutlicht, dass keine Expressionsunterschiede vorliegen, sondern die Stabilität der Mutante beeinflusst ist. Demnach ist das Lysin K1047 essentiell für den endozytischen Abbau des INSR.

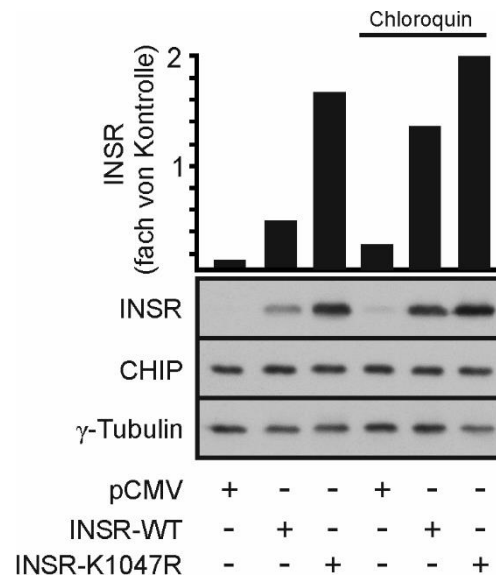


Abbildung 6.20: Analyse des Lysins K1047 im INSR. HEK293-Zellen wurden mit pCMV-INSR-WT und pCMV-INSR-K1047R transfiziert. Als zusätzliche Kontrolle diente der pCMV-Leervektor. Es konnte eine deutliche Stabilsierung der K1047R-Mutante im Vergleich zum INSR-WT detektiert werden. Durch Inhibition des autophagisch-lysosomalen Abbaus konnte die Proteinmenge des wildtypischen INSR an der der K1047R-Mutante angeglichen werden. Demnach führt die K1047R-Mutation zu einem verminderten endozytischen Abbau des INSR. Es wurden 40 µg Protein pro Probe geladen.

6.2.15 CHIP-vermittelter INSR-Abbau ist Insulin unabhängig

In Anwesenheit von Insulin oligomerisiert der INSR, vollzieht eine konformationelle Veränderung und phosphoryliert sich selbst (Russell et al., 1987). Dies führt zur Aktivierung des IIS und endet in der Internalisierung des Rezeptors über Endozytose (Gavin et al., 1974; Green und Olefsky, 1982; Okabayashi et al., 1989). Um zu analysieren, welchen Einfluss Insulin auf den CHIP-induzierten Abbau des INSR ausübt, wurde CHIP in HEK293-Zellen depletiert. Anschließend erfolgte die Behandlung der Zellen mit und ohne Insulin. Kontrollzellen wiesen einen signifikanten Abbau des INSR aufgrund der Insulinbehandlung auf. Zellen, in denen CHIP depletiert war, zeigten ebenfalls eine signifikante Reduzierung der INSR-Proteinmenge

vergleichbar zu Kontrollzellen. Demnach übt Insulin keinen Einfluss auf den CHIP-induzierten Abbau des INSR aus.

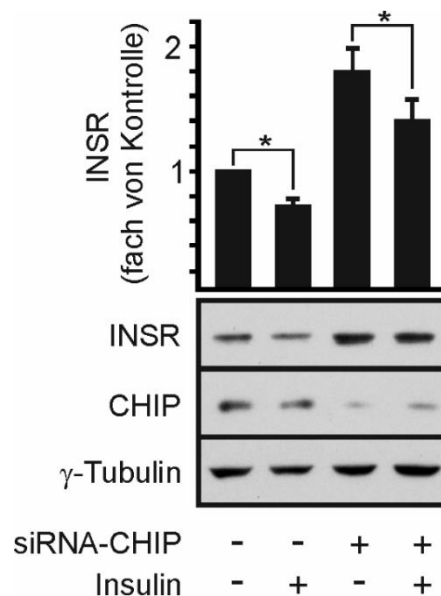


Abbildung 6.21: Der CHIP-induzierte INSR-Abbau ist Insulin-unabhängig. HEK293-Zellen wurden transient mit siRNA gegen CHIP transfiziert (48h) und anschließend mit Insulin behandelt (100 nM, 20 h). Die Insulin-Behandlung der Zellen führte zum Abbau des INSR auf Proteinebene. Dieser konnte durch CHIP-Depletion nicht verhindert werden. Demnach ist der CHIP-induzierte Abbau des INSR Insulin-unabhängig. Es wurden jeweils 40 μ g Protein geladen. Fehlerbalken beziehen sich auf den Standardfehler der Mittelwerte (SEM). Sterne weisen auf die mathematische Signifikanz nach dem ANOVA-Test hin.

6.2.16 CHIP-Expression verhindert Paraquat-induzierte INSR Akkumulation

Es sollte untersucht werden, welche Auswirkungen oxidativer Stress auf die INSR-Stabilität hat und inwiefern die Proteostasefunktion von CHIP sich auf den CHIP-vermittelten endozytischen Abbau des INSR auswirkt. Dazu wurden HEK293-Zellen mit dem Bipyridin-Herbizid Paraquat behandelt. Paraquat erzeugt reaktive Sauerstoffradikale, die Proteine oxidieren und dadurch weitreichende Veränderungen in ihrer Struktur bis hin zur Schädigung und Akkumulation herbeiführen. Diese Proteine müssen abgebaut werden um das Überleben der Zelle zu gewährleisten. Die Behandlung der HEK293-Zellen mit Paraquat führte zu einer signifikanten Stabilisierung des INSR im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Offensichtlich führt die Akkumulation beschädigter Proteine zu einer Stabilisierung des INSR. Bei Paraquatbehandlung und gleichzeitiger Überexpression von CHIP konnte die Stabilisierung des INSR verhindert werden. Das Expressionsniveau des INSR war vergleichbar zur Kontrolle ohne

Paraquatbehandlung. Dies lässt den Schluss zu, dass CHIP in Stresssituationen wie dem oxidativen Stress für den Abbau fehlgefalteter Proteine benötigt wird und den INSR dadurch nicht mehr abbauen kann. Demzufolge ist CHIP ein limitierender Faktor im Proteostasenetzwerk und seine Depletion wirkt sich unmittelbar auf den Abbau des INSR aus.

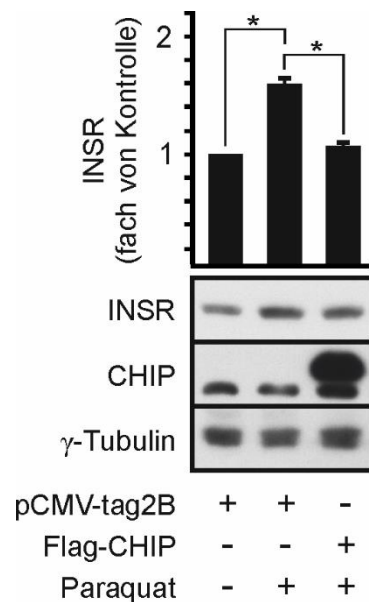


Abbildung 6.22: CHIP-Expression verhindert die Paraquat-induzierte Akkumulation des INSR. HEK293-Zellen wurden transient mit pCMV-tag2B und pCMV-CHIP transfiziert (48h) und anschließend mit Paraquat behandelt (20 mM, 20 h). Die Behandlung der Zellen mit Paraquat führte zu einer signifikanten Akkumulation des INSR auf Proteinebene. Bei gleichzeitiger Überexpression von CHIP konnte diese Akkumulation nicht mehr beobachtet werden. Es wurden jeweils 40 µg Protein eingesetzt. Fehlerbalken beziehen sich auf den Standardfehler der Mittelwerte (SEM). Sterne weisen auf die mathematische Signifikanz nach dem ANOVA-Test hin.

6.2.17 DCHIP-Depletion in adulten Fliegen führt zur Akkumulation von oxidativ-geschädigten Proteinen

Um zu überprüfen, ob das *Drosophila* Ortholog DCHIP ebenfalls beim Abbau oxidativ-geschädigter Proteine beteiligt ist, wurde DCHIP ubiquitär in Fliegen depletiert und es folgte die Analyse gealterter Fliegen mit Hilfe des Oxyblot-Systems. Sowohl Seneszenz als auch oxidativer Stress führen zu charakteristischen Carbonylierungsreaktionen bestimmter Aminosäurereste, die letztlich zum Funktionsverlust des jeweiligen Proteins führen (Nyström et al., 2005). Diese carbonylierten Protein-Spezies lassen sich mit Hilfe einer Derivatisierungsreaktion mit anschließender Inkubation eines Antikörpers im Western-Blot nachweisen. In den DCHIP-depletierten Fliegen war eine deutliche Zunahme an oxidativ-

geschädigten Proteinen nach bereits einer Woche im Vergleich zur Kontrolle nachweisbar. Gleiches konnte bei 5 Wochen gealterten DCHIP-depletierten Fliegen beobachtet werden. Insgesamt konnte ein Anstieg der Gesamtmenge an oxidativ-geschädigten Proteinen während des Alterns beobachtet werden (Berlett und Stadtman, 1997; Finkel und Holbrook, 2000). Demnach spielt DCHIP, wie sein Homolog in Säugern, eine Rolle beim Abbau oxidativ-geschädigter Proteine in *Drosophila melanogaster*.

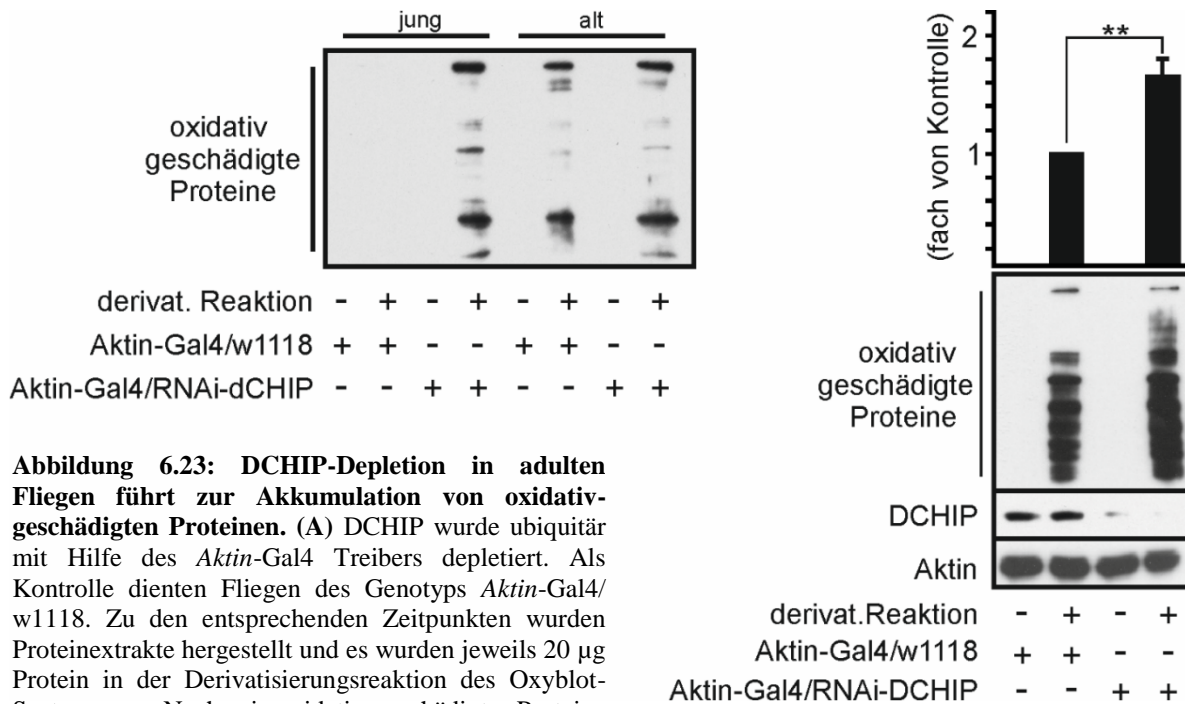


Abbildung 6.23: DCHIP-Depletion in adulten Fliegen führt zur Akkumulation von oxidativ-geschädigten Proteinen. (A) DCHIP wurde ubiquitär mit Hilfe des *Aktin-Gal4* Treibers depletiert. Als Kontrolle dienten Fliegen des Genotyps *Aktin-Gal4/w1118*. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden Proteinextrakte hergestellt und es wurden jeweils 20 µg Protein in der Derivatisierungsreaktion des Oxyblot-Systems zum Nachweis oxidativ-geschädigter Proteine eingesetzt. Schon bei jungen Fliegen (1 Woche alt) wurde deutlich, dass die DCHIP-Depletion zu einer Akkumulation oxidativ-geschädigter Proteine im Vergleich zu Kontrollfliegen führte. Zusätzlich konnte ein Anstieg von oxidativ-geschädigten Proteinen von jungen zu alten Kontrollfliegen (5 Wochen alt) beobachtet werden. (B) Dieser Anstieg war in alten Fliegen, in denen DCHIP depletiert war zu alten Kontrollfliegen nochmals signifikant verstärkt. Fehlerbalken beziehen sich auf den Standardfehler der Mittelwerte (SEM). Sterne weisen auf die mathematische Signifikanz nach dem ANOVA-Test hin.

6.2.18 DCHIP-Depletion in adulten Fliegen führt zur Akkumulation des dInR

Es sollte analysiert werden, ob CHIP auch in *Drosophila melanogaster* die Proteinstabilität des *Drosophila* Orthologs des INSR beeinflusst. Dazu wurde DCHIP in adulten Fliegen depletiert. Anschließend erfolgte die Detektion des *Drosophila* Insulinrezeptors (dInR) im Western-Blot. Bei eine Woche alten Fliegen konnte eine signifikante Zunahme des dInR im Vergleich zu

Kontrollfliegen detektiert werden. Gleiches konnte in vergleichbarer Form in 5 Wochen alten Fliegen beobachtet werden. Zudem wurde apparent, dass in alten Kontrollfliegen die dInR-Proteinmenge im Vergleich zu jungen Kontrollfliegen stark anstieg. Proportional dazu konnte eine Zunahme der DCHIP-Proteinmenge beobachtet werden. Dies lässt den Schluß zu, dass alleine das Altern der Fliegen zu einer verstärkten Akkumulation des dInR und DCHIP auf Proteinebene führt. Bei zusätzlicher Depletion von DCHIP wurde die Akkumulation des dInR nochmals signifikant verstärkt. Dies deutet darauf hin, dass der *Drosophila* Insulinrezeptor ähnlich wie in Säugerzellen ein Substrat von DCHIP ist.

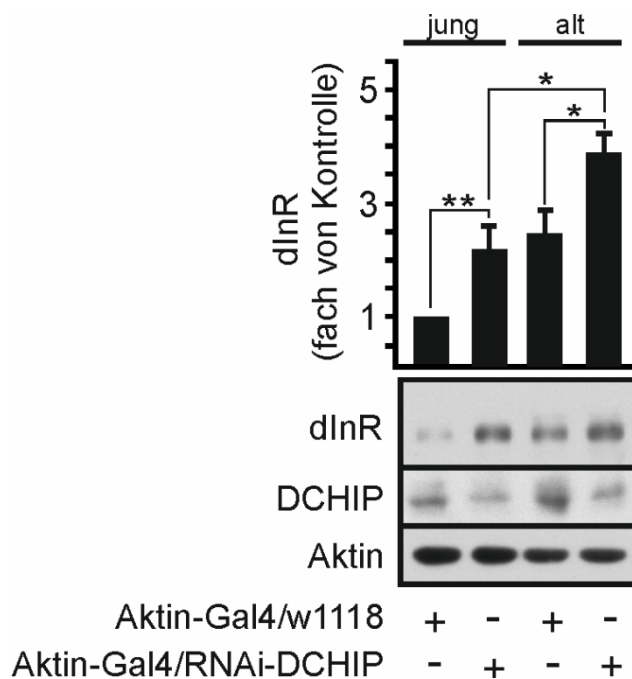


Abbildung 6.24: DCHIP-Depletion in adulten Fliegen führt zur Stabilisierung des *Drosophila* Insulinrezeptors (dInR). Die RNAi-Linie gegen DCHIP wurde mit der Treiberlinie *Aktin-Gal4* gekreuzt um eine ubiquitäre Depletion von DCHIP zu erzielen. Als Kontrolle diente *Aktin-Gal4*-Fliegen gekreuzt mit Wildtypfliegen (w1118). Zunächst wurden die Fliegen gealtert. Anschließend wurde aus den Fliegen nach einer Woche (jung) und nach 5 Wochen (alt) Proteinextrakte erstellt und im Western-Blot analysiert. Nach einer Woche konnte eine signifikante Stabilisierung der dInR-Proteinmenge in den DCHIP-depletierten Fliegen im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Zudem wurde ersichtlich, dass die dInR-Proteinmenge während des Alterungsprozesses von jungen gegenüber alten Kontrollfliegen anstieg. Diese altersabhängige Stabilisierung des dInR war durch die Depletion von DCHIP in alten Fliegen nochmals signifikant verstärkt. Es wurden jeweils 60 µg Protein geladen. Fehlerbalken beziehen sich auf den Standardfehler der Mittelwerte (SEM). Sterne weisen auf die mathematische Signifikanz nach dem ANOVA-Test hin.

7 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte die Ubiquitinligase CHIP als molekulares Bindeglied zwischen der Proteinhomöostase (Proteostase) und der Alterung identifiziert werden. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass der Insulinrezeptor (INSR) ein Substratprotein von CHIP ist. CHIP bindet direkt an den Rezeptor und monoubiquitiniert diesen, was den Abbau des INSR durch Endozytose zur Folge hat. Demnach führt der Verlust der CHIP Funktion zu einer Stabilisierung des INSR und einer damit einhergehenden verstärkten Aktivierung des Insulin Signalwegs (IIS). Auf organismischer Ebene kommt es zu einer verkürzten Lebensspanne. In *Drosophila melanogaster* konnte der Mitteldarm als Gewebe identifiziert werden, welches während der Alterung auf eine CHIP-Funktion angewiesen ist. Neben der Funktion als Proteinqualitätskontrollligase, in der CHIP fehlgefaltete Proteine zum Abbau markiert, reguliert CHIP demnach auch spezifische Substratproteine und beeinflusst den Alterungsprozess durch eine Regulation des INSR und des IIS. Wie dies im Detail geschieht, soll in den folgenden Kapiteln diskutiert werden.

7.1 CHIP als molekulares Bindeglied zwischen Proteostase und Alterung

CHIP wurde zuerst als Interaktionspartner von Hsc70 in humanen Skelettmuskelzellen beschrieben, der den Hsp40-vermittelten ATPase-Zyklus von Hsc70 negativ reguliert (Ballinger et al., 1999). Über die Jahre wurde zunehmend deutlich, dass es sich bei CHIP um eine Ubiquitinligase handelt, die maßgeblich an der Proteinqualitätskontrolle beteiligt ist. Bei der Neusynthese von Proteinen assistieren Chaperone wie Hsc70 als Faltungshelfer und schirmen hydrophobe Bereiche des neugebildeten Proteins vom zellulären Milieu ab, damit das Protein in seine native Konformation gefaltet werden kann. Ist dies nicht möglich, muss das Protein abgebaut werden, um eine zytotoxische Aggregation zu verhindern. Dazu bindet CHIP an Hsc70 und ubiquitiniert Hsc70-gebundene Substratproteine und markiert diese zum Abbau über das 26S-Proteasom oder durch Autophagie. Die Proteinqualitätskontrolle ist jedoch nicht nur auf die Neusynthese von Proteinen beschränkt, sondern besitzt ebenso Gültigkeit bei fehlgefalteten

Proteine die im Zuge unterschiedlichster zellulärer Prozesse auftreten. Unter anderem konnte gezeigt werden, dass unter diversen Stresssituationen wie dem Hitzestress Proteine partiell denaturieren und Chaperone wie Hsc70 an die nun präsentierten hydrophoben Bereiche binden, die normalerweise im Inneren der Proteinstruktur verborgen liegen. Können diese Proteine nicht mehr rückgefaltet werden, erfolgt der CHIP-vermittelte Abbau im 26S-Proteasom. Der überzeugendste Beweis, dass es sich bei CHIP um eine Ubiquitinligase der Proteinqualitätskontrolle handelt, konnte erbracht werden, in dem gezeigt wurde, dass CHIP Hsp70- oder Hsp90-gebundene Hitze-denaturierte Luciferase ubiquitiniert, nicht aber die nativ gefaltete Luciferase (Connell et al., 2001; Jiang et al., 2001). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass CHIP den HSF-1 Transkriptionsfaktor („*heat shock factor 1*“) aktivieren kann und dabei selbst ein HSF-1 Zielgen ist (Dai et al., 2003; Dikshit et al., 2007). Demnach ist CHIP in der Lage die eigene Expression durch HSF-1 zu regulieren und in proteotoxischen Stresssituationen wie dem Hitzestress oder poly-Q-Aggregation transkriptionell zu induzieren (Dikshit et al., 2007; Stankowski et al., 2011). Dies unterstreicht die Funktion von CHIP beim Abbau fehlgefalteter Proteine und beim Erhalt der Proteostase. CHIP konnte zudem mit dem Abbau einer Vielzahl aggregationsanfälliger Proteine in Neuronen in Verbindung gebracht werden, darunter prominente Substratproteine wie das Alzheimersche tau und poly-Q Huntingtin (Petrucci et al., 2004; Miller et al., 2005). Dabei ist die Substraterkennungssequenz im Kern stets eine Abfolge von 4 bis 5 hydrophoben Aminosäuren, die aufgrund von Faltungsstress präsentiert werden und die meist von Hsc70 erkannt werden (Fourie et al., 1994; Takenaka et al., 1995; Rüdiger et al., 1997). Im Falle des tau Proteins konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem hydrophoben Bindemotif, welche die Hsc70-Interaktion vermittelt, um die gleiche Domäne handelt, die für die Aggregation von hyperphosphoryliertem tau verantwortlich ist (Sarkar et al., 2008). Demnach verhindert Hsc70 die Aggregation von tau, in dem es die hydrophobe Erkennungssequenz vor dem zytoplasmatischen Milieu abschirmt und fehlgefaltetes tau Protein im Zusammenspiel mit CHIP proteasomal abbaut (Shimura et al., 2004). Die Liste der CHIP-Substratproteine konnte in den vergangenen Jahren stetig erweitert werden. Weiterhin konnte im Muskel ein neuer CHIP-vermittelter Abbauweg identifiziert werden, die Chaperon-assistierte selektive Autophagie (CASA) (Arndt et al., 2010). Muskeln sind aufgrund von Kontraktionen permanent mechanischem und oxidativem Stress ausgesetzt. Dabei kommt es zur Abnutzung des unter Spannung-stehenden Gerüstproteins Filamin, welches partiell denaturiert und letztlich aggregiert. Hsc70 bindet Filamin und ubiquitiniert dieses im Zusammenspiel mit dem kleinen Hitzeschockprotein HspB8, dem Cochaperon BAG-3 und CHIP. Durch Rekrutierung des

Ubiquitinadapters p62 wird nun das durch CHIP ubiquitinierte Filamin an LC3 gekoppelt und in ein Autophagosom eingeschnürt. Anschließend fusioniert das Autophagosom mit dem Lysosom und es erfolgt der Abbau durch lysosomale Proteasen.

Eine weitere Art der CHIP-Funktion stellt die Ubiquitinierung des Endozytose-Adapters Epsin dar (Timsit et al., 2005). Jedoch dient diese CHIP-vermittelte Ubiquitinierung nicht als Abbausignal, sondern sie aktiviert Epsin. Epsin ist ein Ubiquitin-Adapterprotein, dass über seine 2 UIM-Domänen („*ubiquitin interacting motifs*“), ubiquitinierte Cargoproteine bindet und sie den Clathrin-beschichteten Vesikeln zuführt. Zudem fungiert Epsin als eine Art Kopplungsfaktor zwischen Eps15 und dem AP2-Komplex, der Hauptkomponente der Clathrin-vermittelten Endozytosemaschinerie, und ist beim „*coating*“ (Umhüllen des Vesikels mit Clathrinmolekülen) und bei der Abschnürung von Vesikeln beteiligt. Neuere Erkenntnisse deuten auf einen engen funktionellen Zusammenhang zwischen Endozytose und dem Ubiquitinsystem hin (Hicke and Dunn, 2003). Dabei reguliert Ubiquitinierung Endozytose auf zwei unterschiedlichen Ebenen durch:

- (1) Mono- /Polyubiquitinierung des Cargo-Proteins, welches als Signal essentiell für die Internalisierung plasmamembranständiger Proteine durch Endozytose ist, und
- (2) Monoubiquitinierung von Proteinen der endozytischen Transportmaschinerie zur Aktivierung.

Ein prominentes Beispiel ist der EGF-Rezeptor, der durch Hormonstimulation monoubiquitiniert und über Endozytose internalisiert und abgebaut wird (Haglund et al., 2003). Zudem konnte der CHIP-vermittelte Abbau des GHR über Endozytose beschrieben werden (Slotman et al., 2012). Die Monoubiquitinierung der Lysine K1047 und K1057 durch CHIP scheinen dabei essentiell für den endozytischen Abbau des INSR zu sein, denn Mutationen dieser Lysine konnten in Patienten mit Diabetes in Verbindung gebracht werden. Eine Aminosäure-Austausch-Analyse des Lysins K1047 zu Arginin zeigte eine signifikante Stabilisierung des INSR aufgrund der Mutation in HEK293-Zellen (Kusari et al., 1991; Moller et al., 1990; Kapitel 5.2.14). Demnach ist die Ubiquitinligasefunktion von CHIP nicht nur an der Substratmarkierung sondern auch am endozytischen Prozess aktiv beteiligt und fördert somit den Abbau von plasmamembranständigen Hormonrezeptoren über Endozytose.

Die zuvor beschriebenen Funktionen von CHIP verdeutlichen die Ausnahmestellung des CHIP-vermittelten Abbaus zum Erhalt der Proteostase. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass eine CHIP-Defizienz zu einer verkürzten Lebensspanne mit einer einhergehenden reduzierten

Stresstoleranz führte (Dai et al., 2003; Min et al., 2008). Dabei konnte eine erhöhte Apoptoserate in unterschiedlichsten Geweben beobachtet werden. Demnach scheint CHIP die Lebensspanne auf eine Art und Weise zu regulieren, die schlussendlich zu Apoptose, dem programmierten Zelltod, führt. Um dies nun tiefergehend zu erforschen, wurde eine ubiquitäre Depletion von CHIP in *Drosophila melanogaster* durchgeführt. Wie zu erwarten war, führte die ubiquitäre Depletion vergleichbar mit CHIP-defizienten Mäusen ebenfalls zu einer reduzierten Lebensspanne (Abb. 6.3). Aufgrund der bereits beschriebenen Funktionen von CHIP in der Muskulatur und in neuronalen Zellen, lag die Vermutung nahe, dass CHIP gerade in diesen Geweben von zentraler Bedeutung für den Erhalt der Proteostase ist und dass ein gewebespezifischer Verlust der CHIP-Funktion zu einer verkürzten Lebensspanne führen würde, ähnlich der ubiquitären Depletion von CHIP. Jedoch hatte ein Verlust der CHIP-Funktion in genau diesen beiden Geweben keinerlei Auswirkungen auf die Lebensspanne. Möglicherweise liegt auf Ebene der E3-Ligase eine gewebespezifische Redundanz vor. Das bedeutet, dass andere Ligasen die Funktion von CHIP in der Muskulatur und in Neuronen übernehmen können. Genau solches konnte beim Abbau von tau in Neuronen beschrieben werden, denn eine Defizienz der E3-Ligase Parkin führt ähnlich der CHIP-Defizienz zu einer Akkumulation von hyperphosphoryliertem tau (Petrucci et al., 2004; Dickey et al., 2006; Zhang et al., 2008; Dickey et al., 2008). Ähnliches konnte kürzlich in der Muskulatur von Mäusen nachgewiesen werden, denn die muskelspezifische E3-Ligase MG53 ist in der Lage den INSR zu ubiquitinieren (Song et al., 2013). Demnach handelt es sich bei der verkürzten Lebensspanne entweder um einen systemischen Effekt oder ein anderes Gewebe, welches auf die Funktion von CHIP angewiesen ist und in der keine andere E3-Ligase die CHIP-Funktion übernehmen kann, ist für die verkürzte Lebensspanne verantwortlich.

Dazu wurden weiterführende gewebespezifische Analysen in dieser Arbeit durchgeführt. Der Verlust der CHIP Funktion im „*fatbody*“ (*Drosophila* Ortholog der Leber und des Fettgewebes) und des Mitteldarms führte ebenfalls zu einer Reduktion der Lebensspanne, während eine Depletion nur im „*fatbody*“ keine Auswirkungen auf die Lebensspanne hatte. Es lag der Schluss nahe, dass der Mitteldarm das Gewebe ist, welches auf eine CHIP-Funktion während des Alterns angewiesen ist und welches letztlich für die reduzierte Lebensspanne verantwortlich ist. Eine Mitteldarm-spezifische Depletion bestätigte eine stark reduzierte Lebensspanne der Fliegen und demnach konnte der Mitteldarm als das Gewebe identifiziert werden, welches auf eine CHIP-Funktion angewiesen ist. Warum aber wirkt sich gerade die Depletion von CHIP im Mitteldarm so dramatisch auf die Lebensspanne der Fliegen aus?

Der Mitteldarm stellt eines der wichtigsten Organe des Körpers dar und erfüllt mehrere überlebenswichtige Aufgaben. Die bekannteste darunter ist die der Aufnahme von Nährstoffen wie Zucker und Lipide. Zum anderen stellt er den Kontakt des Körpers mit der Außenwelt dar und hat in diesem Sinne eine wichtige Barrierefunktion. Er bewahrt den Körper vor schädlichen Umwelteinflüssen und pathogenen Mikrobiota. Der Mitteldarm ist in sogenannten Krypten und Villi angeordnet, die zottenförmig ins Innere des Darmlumens ragen. Ausgehend von den Krypten differenzieren pluripotente Stammzellen („ISC’s = *intestinals stem cells*“) apico-lateral in Enterozyten und enteroendokrine Zellen (Biteau et al., 2010; Jiang und Edgar, 2011; Buchon et al., 2013). Funktion dieser Zellen ist es ein physiologisches Milieu der „Mucosa“ zu generieren und die Mikrobiota zu bekämpfen, um die Stoffwechselfunktion des Epithels aufrechtzuerhalten. Dazu sekretieren exokrine Enterozyten stets AMP’s („*anti microbial peptides*“), welche die sich unmittelbar in der Nähe des Epithels ansiedelnden Mikrobiota abtöten. Dies bewahrt die Stoffwechselfunktion des Epithels und verdeutlicht zugleich, dass das Mitteldarmepithel immunologisch aktiv ist. Zudem handelt es sich bei einigen Enterozyten um endokrine Zellen, die Hormone ins Blut abgeben und somit den Nährstoffstatus, die Nährstoffaufnahme und den Appetit kommunizieren (Veenstra et al., 2008; Reiher et al., 2011). In *Drosophila melanogaster* sind 8 Insulin-ähnliche Peptidhormone bekannt, die überwiegend in den IPC’s („*insulin producing cells*“) im Gehirn, dem Fettkörper und dem Mitteldarm gebildet und in den Blutkreislauf („Hämolymphe“) ausgeschüttet werden (Grönke et al., 2010; O’Brien et al., 2011; Nässel et al., 2013). Mittlerweile konnte eine Vielzahl weiterer Peptidhormone identifiziert werden, die ihren Ursprung im Mitteldarm haben und deren Aufgabe es ebenfalls ist, den Nahrungs- sowie den Stoffwechselstatus zwischen den Organen zu kommunizieren (Reiher et al., 2011). In diesem Zusammenhang konnte der Mitteldarm als Ursache für Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus und dem metabolischen Syndrom identifiziert werden (Sanyal, 2013). Zudem stellt das Mitteldarmepithel das sich am schnellsten regenerierende Gewebe des Körpers dar, welches sich alle 2-3 Tage vollständig erneuert. Demnach ist die Proliferationsrate dort sehr hoch und es kommt zu Wachstumsstress. Verantwortlich für die Erneuerung des Epithels sind die zuvor erwähnten Intestinalen Stammzellen („ISC’s“). Kleinste Veränderungen können dort zu Displasien (Fehlbildungen des Epithels die zum Funktionsverlust führen) oder Tumoren führen, die die Lebensspanne beeinflussen (Radtke und Clevers, 2005; Ohlstein und Spradling, 2006). Der IIS konnte zudem direkt mit der Zellproliferation der ISC’s und der Regeneration des Mitteldarmepithels in *Drosophila* in Verbindung gebracht werden (Amcheslavsky et al., 2009; Choi et al., 2011). Die

Stabilisierung des INSR und die einhergehende Aktivierung des IIS durch die CHIP-Depletion könnte die Ursache für die im Mitteldarm hervorgerufene Kurzlebigkeit sein. In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu beobachten, ob sich aufgrund der CHIP-Depletion im Alter die Proliferationsrate im Mitteldarm verändert oder ob phänotypische Veränderungen bishin zur Displasienbildung auftreten. Ein verändertes Verhalten bei der Nahrungsaufnahme CHIP-defizienter Mäuse konnte nicht beobachtet werden, denn in Biopsien konnte Nahrung im Magen der Tiere nachgewiesen werden (Dai et al., 2003). Demnach scheint es keine Veränderungen der Nahrungsaufnahme per se in CHIP-defizienten Mäusen zu geben. Vielmehr scheint die verstärkte Aktivierung des IIS ausschlaggebend für die Kurzlebigkeit und ein verfrühtes Altern zu sein. Inwiefern sich eine chronische Aktivierung des IIS auf die Lebensspanne auswirkt, soll im anschließenden Kapitel näher betrachtet werden.

7.2 CHIP beeinflusst das Altern durch Regulation des IIS

Wie wirkt sich nun eine Stabilisierung des INSR auf Proteinebene aus? Die Altersforschung der letzten beiden Jahrzehnte deuten auf eine zentrale Rolle des Insulin Signalwegs (IIS) bei der Regulation der Lebensspanne hin (Guarente und Kenyon, 2000; Gems und Partridge, 2001; Dillin, 2002). In *C. elegans* und in *Drosophila melanogaster* konnte gezeigt werden, dass eine Hyperaktivierung des IIS zu Kurzlebigkeit führt, während hingegen eine reduzierte Aktivität des IIS lebensverlängernd ist (Hsu et al., 2003; Giannakou und Partridge, 2007; Kaletsky und Murphy, 2010). In einer Genom-weiten RNAi-Analyse konnten Gene identifiziert werden, die den langlebigen DAF-2 (*C-elegans* Ortholog des INSR)-Mutanten Phänotyp in *C. elegans* wieder aufhoben, darunter eine Vielzahl von Genen, die bei der Endozytose beteiligt sind (Samuelson et al., 2007). Dies spricht dafür, dass eine intakte Endozytose des INSR/DAF-2 für die Langlebigkeit essentiell ist.

In Kapitel 6.2.1 konnte gezeigt werden, dass aufgrund der CHIP-abhängigen INSR Stabilisierung auf Proteinebene p-AKT Level signifikant erhöht waren. Demnach ist der IIS verstärkt aktiv in CHIP-depletierten Zellen. AKT ist als zentrale Kinase des IIS vor allem interessant, weil sie neben der Inhibition von Apoptose und Aktivierung der Proteintranslation die Aktivität des FOXO-Transkriptionsfaktors negativ reguliert (Kapitel 2.6). Denn sowohl in *C. elegans* als auch in *Drosophila melanogaster* konnte gezeigt werden, dass der lebensverlängernde Effekt der dInR/DAF-2 Mutanten und vieler anderer IIS-Mutanten dFOXO/DAF-16 abhängig ist (Gottlieb

und Ruvkun, 1994; Lin et al., 1997; Lin et al., 2001). dFOXO/DAF-16 Mutanten selbst weisen hingegen eine verkürzte Lebensspanne und eine verringerte Stressresistenz auf (Jünger et al., 2003; Salih und Brunet, 2008). Ein weiteres Indiz dafür, dass die Langlebigkeit der DAF-2-Mutanten DAF-16-abhängig ist, konnte in *C. elegans* erbracht werden, denn die Kreuzung der langlebigen DAF-2 Mutante in den DAF-16 Nullmutanten Hintergrund konnte die Kurzlebigkeit der DAF-16 Mutanten nicht aufheben (Guarente und Kenyon, 2000; Gems und Partridge, 2001; Lin et al., 2001).). FOXO induziert die Transkription einer Vielzahl von Stressgenen unter anderem die der oxidativen Abwehr und der DNA-Reparatur. Desweiteren verhindert FOXO die Zellproliferation durch Expression von Zellzyklussinhibitoren wie zum Beispiel p21/p27 oder durch transkriptionelle Repression der Zellzyklus-fördernden Cycline D1 und D2 (Murphy, 2006; Van der Vos und Coffey, 2011). In der Arbeitsgruppe von Professor Hoppe konnte die Kurzlebigkeit, die durch eine Mutation im CHIP des Nematoden *C. elegans* (CHN-1) hervorgerufen wurde, sowohl durch Kreuzung einer Doppelmutante DAF-2; CHN-1 als auch durch Expression von DAF-16/FOXO wieder aufgehoben werden. Die CHN-1-Mutanten lebten also wieder so lange wie der Wildtyp. Dies weist auf eine eindeutige DAF-16/FOXO Abhängigkeit des CHN-1-Mutanten Phänotyps hin. Bei aktivem IIS wird FOXO durch AKT phosphoryliert und inaktiviert. Während des Alterungsprozesses konnte ein genereller Anstieg an FOXO-Aktivität beobachtet werden. Dies kann unter anderem damit erklärt werden, dass sich durch die Vielzahl zellulärer Prozesse im Alter systemische Fehler durch Mutationen, fehlerhafte Translation und andere Umwelteinflüsse anhäufen, die zu einer erhöhten Stresssituation führen. Eine Sonderstellung nimmt hierbei die Bildung von Sauerstoffradikalen ein, die zytotoxische Eigenschaften aufweisen. Reaktive Sauerstoffspezies („ROS = *reactive oxygen species*“) wie H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot -}$ und OH^{\cdot} entstehen als Nebenprodukte der Atmungskette, dem Stoffwechsel von Nährstoffen wie zum Beispiel dem Zuckerstoffwechsel oder der β -Oxidation von Fettsäuren. Sie können DNA, Proteine und Lipide beschädigen. Zum Beispiel führt oxidativer Stress zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und zur Induktion von Apoptose, dem programmierten Zelltod (Satoh et al., 1997; Vayssier-Taussat et al., 2002). Die Zelle wirkt dagegen mit einem Schutzsystem bestehend aus Antioxidantien, den Vitaminen, und Enzymen, welche die Sauerstoffradikale zu weniger toxischen Intermediaten reduzieren. Unter diesen Enzymen befindet sich die Superoxiddismutase SOD-3, die das Superoxidradikal ($\text{O}_2^{\cdot -}$) reduziert und die Katalase, die Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu H_2O und O_2 reduziert (Jeney et al., 2005; Landis und Tower, 2005). Bei beiden Enzymen handelt es sich um FOXO-Zielgene (Kops et al., 2002). In der Arbeitsgruppe von Professor Hoppe konnte beobachtet werden, dass SOD-3 aufgrund der

CHN-1-Nullmutation transkriptionell vermindert exprimiert wurde. Dies würde erklären, wieso eine dInR-Stabilisierung und die daraus resultierende Inaktivierung von dFOXO in den DCHIP-depletierten Fliegen zu einer Akkumulation oxidativ-geschädigter Proteine führt. Oxidativer Stress kann in hohem Maße das Absterben der Zellen durch Apoptose zur Folge haben, was letztlich zum Tode der Tiere führt. In CHIP-defizienten-Mäusen, die ebenfalls kurzlebig sind und eine verminderte Stresstoleranz aufweisen, konnte eine erhöhte Apoptoserate beobachtet werden (Dai et al., 2003). Interessant wäre hier zu beobachten, ob die DCHIP-Depletion ebenfalls zur Apoptose führt und ob die verursachte Kurzlebigkeit der Fliegen durch Zugabe von Vitaminen ins Futter wieder aufgehoben werden kann. Dies könnte Aufschluss darüber geben, ob die Akkumulation von oxidativ-geschädigten Proteinen die Ursache für die verstärkte Apoptose in DCHIP-depletierten Fliegen und der beobachteten Kurzlebigkeit ist. Einen weiteren direkten Einfluss hat die INSR-Stabilisierung und die damit einhergehende Aktivierung des IIS durch die negative Regulation des HSF-1 Transkriptionsfaktors. Bei aktivem Insulin Signalweg wird HSF-1 durch Komplexierung mit DDL-1 und DDL-2 inhibiert. Dabei wird die phosphorylierungsabhängige DDL-1 und DDL-2 Bindung an HSF-1 durch den IIS vermittelt (Chiang et al., 2012). Der HSF-1 Signalweg ist als einer der bedeutensten Stresssignalwege zu betrachten, denn er reguliert die Expression von Chaperonen und ist somit als Regulator der Proteostase von essentieller Bedeutung. Das Fehlen von HSF-1 führt zur Bildung von zytotoxischen β -amyloiden Einschlüssen und anderer Proteinaggregate und fördert somit die Entstehung von Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson und Huntington (Meacham et al., 2001; Shin, 2005; Dickey et al., 2007). Sowohl die Depletion als auch die Mutation von HSF-1 in *C. elegans* führt zu einer dramatischen Verkürzung der Lebensspanne, während die verstärkte Expression oder gar die Einführung von zusätzlichen Kopien des HSF-1 Gens zu einer deutlichen Lebensverlängerung führt (Garigan et al., 2002; Hsu et al., 2003). In *Drosophila melanogaster* war auffällig, dass in langlebigen Mutanten stets die kleinen Hitzeschockproteine verstärkt exprimiert waren, welche HSF-1 reguliert sind. Zudem konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass CHIP HSF-1 aktivieren kann und dass die Ligasefunktion dabei unerheblich ist (Dai et al., 2003). Demnach könnte es in gealterten DCHIP-depletierten Fliegen zu einer verminderten HSF-1 Aktivität kommen. Hier wäre es interessant zu beobachten, ob die DCHIP-Depletion in gealterten Fliegen zu einer verminderten Expression von HSF-1 Zielgenen führt und ob dies möglicherweise zur Aggregatbildung führt. In HEK293-Zellen konnte aufgrund der CHIP-Depletion nach 48 h keine verminderte Expression von Hsc/Hsp70 oder Hsp90 detektiert werden, demnach ist die CHIP-Aktivierung von HSF-1 scheinbar altersabhängig (Kapitel 6.2.2).

Obwohl beide Stresssignalwege durch die gleichen Faktoren angeschaltet werden können und beide Wege das Ziel verfolgen das Überleben der Zellen zu sichern, gibt es dennoch Unterschiede. HSF-1 versucht in erster Linie geschädigte Proteine in Lösung zu halten oder kontrolliert abzubauen, in dem es die Expression von Chaperonen erhöht. Zudem wird durch HSF-1 der CHIP vermittelte Abbau gefördert, da auch CHIP ein HSF-1 Zielgen ist (Dikshit et al., 2007). FOXO hingegen beseitigt zum einen zytotoxische Stoffwechselprodukte wie Sauerstoffradikale, zum anderen führt FOXO-Aktivität zum Zellzyklusarrest und zur DNA-Reparatur (Perez, 2012). FOXO wirkt demnach als Inhibitor des Zellzyklusses. Transkriptomanalysen zeigen, dass beide Transkriptionsfaktoren größtenteils unterschiedliche Zielgene aktivieren, es jedoch auch zu Überschneidungen kommt, wie im Falle der kleinen Hitzeschockproteine, deren Expression alleine sich ebenfalls positiv auf die Lebensspanne auswirkt (Morley und Morimoto, 2004; Tonkiss und Calderwood, 2005; Kenyon, 2005; Cohen und Dillon, 2008). Der IIS ist demnach so immens wichtig für ein gesundes Altern, weil eine verminderte Aktivität des IIS sowohl FOXO als auch HSF-1 aktivieren kann. Demnach stellt er eine Schnittstelle dar, zwischen einem gesunden Gleichgewicht zwischen Nahrungsaufnahme und einer milden gesundheitsfördernden Stressantwort um die Bildung und Akkumulation schädlicher Proteinspezies zu verhindern. Eine verminderte Aufnahme von Nährstoffen führt zu einer Lebensverlängerung in Hefen bis hin zu Säugetieren (Bishop und Guarente, 2007; Mair und Dillin, 2008). Eine verstärkte Aktivierung des Insulin Signalwegs führt jedoch zu einer übermäßigen Aufnahme von Nährstoffen wie Zucker und Lipiden, welches dazu führt, dass die Zellen schneller wachsen und die Proliferationsrate gesteigert wird (Straus et al., 1981; Saltiel und Kahn, 2001; Partridge et al., 2011; Chiang et al., 2012). Dementsprechend entstehen mehr zytotoxische Stoffwechselprodukte wie den ROS, es häufen sich Mutationen im Zuge der DNA-Replikation und zusätzlich kommt es zu einer vermehrten Einlagerung von Energiereserven in Form von Glykogen und Lipidtröpfchen („*lipid droplets*“). Der exzessive Aufbau dieser Energiespeicher behindert zelluläre Prozesse und wird mit der Entstehung der Insulin-Resistenz in Verbindung gebracht, eine Erkrankung, bei der Zellen oder Gewebe stark vermindert auf Insulin reagieren (Olofsson et al., 2011). Dies führt zu einem stark erhöhten Blutzuckerspiegel, da die Zellen den Zucker nicht mehr aufnehmen, und begünstigt die Entstehung von Diabetes Typ-2. Zudem führt die erhöhte Nahrungsaufnahme zu einer Reihe von Stoffwechselerkrankungen, die unter dem Begriff „metabolisches Syndrom“ zusammengefasst werden. Dabei handelt es sich um eine Kombination aus Krankheiten, die Hauptrisikofaktoren von Herz-Kreislauf Erkrankungen sind, wie Adipositas und arterielle Hypertonie, dem

Bluthochdruck. Sowohl in Zellkultur als auch in *Drosophila* führte die verstärkte Aktivierung des IIS durch Expression einer dominant-aktiven Form von AKT zu einer verstärkten Akkumulation der Lipidtröpfchen (Vereshchagina und Wilson, 2006; Boren, 2013). In ersten Experimenten konnte in gealterten DCHIP-depletierten Fliegen eine Vergrößerung der Lipidtropfen im Fettkörper, dem *Drosophila* Ortholog der Leber und des Fettgewebes, beobachtet werden. Bei Lipidanalysen von Gesamtfiegenextrakten konnte jedoch keine Zunahme der in den Lipidtröpfchen gespeicherten Di- und Triglyceride festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Zu diesem Zeitpunkt war jedoch noch unklar, dass die DCHIP-Depletion im Mitteldarm für die Kurzlebigkeit hauptverantwortlich ist. Demnach wäre es interessant zu sehen ob sich die Lipidspeicher im Mitteldarm aufgrund des DCHIP-Verlustes verändern.

Zusammenfassend kann nun folgendes Modell erstellt werden: Im jungen Alter sorgt CHIP für einen basalen Insulin-unabhängigen Abbau des INSR über Endozytose. Dies führt indirekt zu einer verminderten Aktivität des IIS und zu einer nur schwachen Inhibition der Transkriptionsfaktoren HSF-1 und FOXO. CHIP ist ausreichend vorhanden und gewährleistet den Abbau fehlgefalteter Proteine und erhält somit die Proteostase. Zu diesem Zeitpunkt ist die Belastung durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und die Akkumulation denaturierter Proteinaggregate im Allgemeinen noch sehr gering. Mit zunehmendem Alter steigt die Bildung der ROS und der denaturierten Proteinaggregate (Kap. 6.2.17). Durch die somit entstehende hohe Belastung durch fehlgefaltete Proteine wird CHIP nun vollends zum Abbau dieser benötigt und kann den INSR nicht mehr effizient umsetzen (Kap. 6.2.16). Dies hat zur Folge, dass sich mit zunehmendem Alter eine verstärkte Aktivität des IIS durch Stabilisierung des INSR durchsetzt und HSF-1 und FOXO nun stärker inhibiert werden. Dadurch kommt es zu einer geringeren Expression von HSF-1- und FOXO-Zielgenen und zu einer verminderten Stressresistenz. Dies führt in der Summe zu einer verkürzten Lebensspanne. Die hier erzielten Befunde etablieren somit die Ubiquitinligase CHIP als Bindeglied zwischen Proteostase und Alterung.

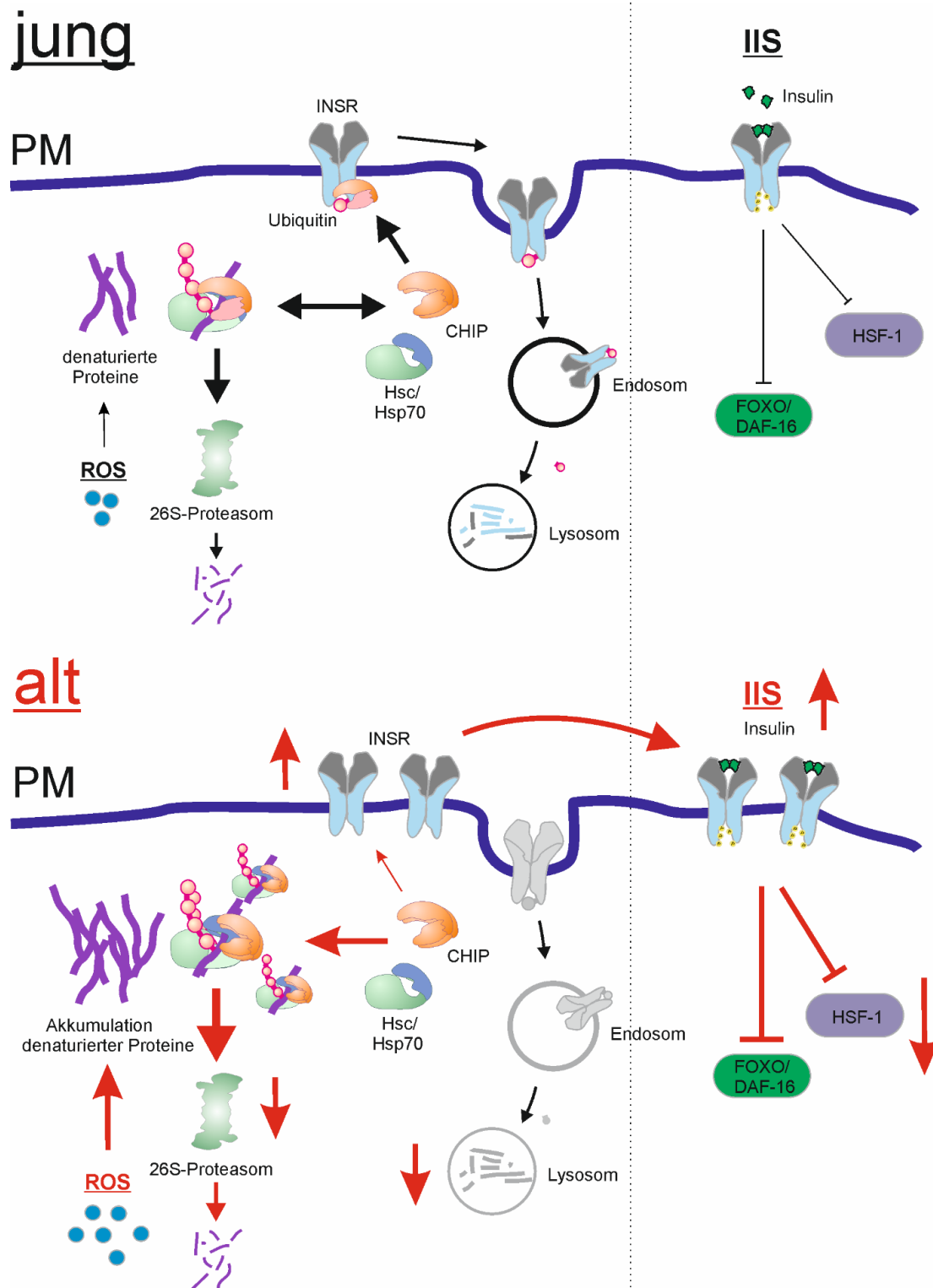


Abbildung 7.1: CHIP reguliert das Altern durch den IIS. Im jungen Alter ist der proteotoxische Stress noch gering. CHIP vermittelt den Abbau von fehlgefalteten Proteinen und dem INSR. Aufgrund dessen erfolgt eine nur schwache Inhibition von HSF-1 und FOXO. Diese sind basal aktiv und erhöhen das Chaperonvorkommen und andere Proteine, die bei der Beseitigung schädlicher Proteinspezies beteiligt sind. Somit tragen beide zum Erhalt einer intakten Proteostase bei. Mit zunehmendem Alter wird der proteotoxische Stress höher, es kommt zur Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies und es bilden sich vermehrt Proteinaggregate. CHIP wird nun benötigt diese zytotoxischen Einschlüsse abzubauen und kann nun nicht mehr den INSR ubiquitinieren und abbauen. Dies führt zu einer erhöhten Stabilität des INSR und indirekt zu einer verstärkten Aktivierung des IIS aufgrund der erhöhten INSR-Proteinmenge. Der aktive IIS inhibiert nun HSF-1 und FOXO und es kommt zu einer signifikanten Reduktion der Lebensspanne aufgrund der verstärkten Aktivierung des IIS.

8 Verzeichnisse

8.1 Literaturverzeichnis

Alberti S., Böhse K., Arndt V., Schmitz A., and Höhfeld J. (2004). The cochaperone HspBP1 inhibits the CHIP ubiquitin ligase and stimulates the maturation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Mol Biol Cell* **15**, 4003-4010.

Alberti, S., Demand, J., Esser, C., Emmerich, N., Schild, H., and Höhfeld, J. (2002). Ubiquitinylation of BAG-1 suggests a novel regulatory mechanism during the sorting of chaperone substrates to the proteasome. *J Biol Chem* **277**, 45920-45927.

Amcheslavsky, A., Jiang, J., and Ip, Y.T. (2009). Tissue damage-induced intestinal stem cell division in *Drosophila*. *Cell Stem Cell* **4**, 49-61.

Amerik A.Y., and Hochstrasser M. (2004). Mechanism and function of deubiquitinating enzymes.

Biochim Biophys Acta **1695**, 189-207.

Arndt V., Daniel C., Nastainczyk W., Alberti S. & Höhfeld J. (2005). BAG-2 acts as an inhibitor of the chaperone-associated ubiquitin ligase CHIP. *Mol Biol Cell* **16**, 5891-5900.

Arndt, V., Dick, N., Tawo, R., Dreiseidler, M., Wenzel, D., Hesse, M., Fürst, D.O., Saftig, P., Saint, R., Fleischmann, B.K., and Höhfeld, J (2010). Chaperone-assisted selective autophagy is essential for muscle maintenance. *Curr Biol* **20**, 143–148.

Ayyadevara, S., Alla, R., Thaden, J.J., and Shmookler Reis, R.J. (2008). Remarkable longevity and stress resistance of nematode PI3K-null mutants. *Aging Cell* **7** (1), 12-22.

Ballinger, C.A., Connell, P., Wu, Y., Hu, Z., Thompson, L.J., Yin, L.Y., and Patterson, C. (1999).

Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. *Mol Cell Biol* **19**, 4535-4545.

Barzilai, N., Guarente, L., Kirkwood, T.B., Partridge, L., Rando, T.A., and Slagboom, P.E., (2012). The place of genetics in ageing research. *Nat Rev Genet* **13**, 589-594.

Baumeister W., Walz J., Zühl F., Seemüller E (1998). The proteasome: paradigm of a selfcompartmentalizing protease. *Cell* **92**, 367-380.

Berlett, B.S., and Stadtman, E.R. (1997). **272** (33), 20313-20316.

Bishop, N.A., and Guarente, L. (2007). Genetic links between diet and lifespan: shared mechanisms from yeast to humans. *Nat Rev Genet* **8** (11), 835-844.

Biteau, B., Karpac, J., Supoyo, S., Degennaro, M., Lehmann, R., and Jasper, H. (2010). Lifespan extension by preserving proliferative homeostasis in *Drosophila*. *PLoS Genet* **6**, e1001159.

Boren, J., Taskinen, M.R., Olofsson, S.O., and Levin, M. (2013). Ectopic lipid storage and insulin resistance: a harmful relationship. *J Intern Med* **274** (1), 25-40.

Brand A.H., and Perrimon N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118** (2), 401-15.

Brehmer, D., Rüdiger, S., Gässler, C.S., Klostermeier, D., Packschies, L., Reinstein, J., Mayer, M.P., and Bukau, B. (2001). Tuning of chaperone activity of Hsp70 proteins by modulation of nucleotide exchange. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 427–432.

Brogiolo, W., Stocker, W., Ikeya, T., Rintelen, F., Fernandez, R., and Hafen, E. (2001). An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Curr Biol* **11** (4), 213-221.

Buchon, N., Osman, D., David, F.P., Fang, H.Y., Boquette, J.P., Deplancke, B., and Lemaitre, B. (2013). Morphological and molecular characterization of adult midgut compartmentalization in *Drosophila*. *Cell Rep* **3** (5), 1725-1738.

Ceresa, B.P., Kao, A.W., Santeler, S.R., and Pessin, J.E. (1998). Inhibition of clathrin-mediated endocytosis selectively attenuates specific insulin receptor signal transduction pathways. *Mol Cell Biol* **18** (7), 3862-3870.

Chang, L., Chiang, S.H., Saltiel, and A.R. (2004). Insulin signaling and the regulation of glucose transport. *Mol Med* **10** (7), 65-71.

Chen, C., Jack, J., Garofalo, R.S. (1996). The *Drosophila* insulin receptor is required for normal growth. *Endocrinology* **137** (3), 846-856.

Chiang, W.C., Ching, T.T., Lee, H.C., Mousigian, C., and Hsu, A.L. (2012). HSF-1 regulators DDL-1/2 link insulin-like signaling to heat-shock responses and modulation of longevity. *Cell* **148** (1-2), 322-334.

Chircop, M., Perera, S., Mariana, A., Lau, H., Ma, M.P., Gilbert, J., Jones, N.C., Gordon, C.P., Young, K.A., Morokoff, A., Sakoff, J., O'Brien, T.J., McCluskey, A., and Robinson, P.J. (2011). Inhibition of dynamin by dynole 34-2 induces cell death following cytokinesis failure in cancer cells. *Mol Cancer Ther* **10** (9), 1553-1562.

Choi, N.H., Lucchetta, E., and Ohlstein, B. (2011). Nonautonomous regulation of *Drosophila* midgut stem cell proliferation by the insulin-signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108** (46), 18702-18707.

Clancy, D.J., Gems, D., Harshman, L.G., Oldham, S., Stocker, H., Hafen, E., Leivers, S.J., and Partridge, L. (2001). Extension of life-span by loss of CHICO, a *Drosophila* insulin receptor substrate protein. *Science* **292** (5514), 104-106.

Cohen, E., and Dillin, A. (2008). The insulin paradox: aging, proteotoxicity and neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* **9** (10), 759-767.

Connell, P., Ballinger, C.A., Jiang, J., Wu, Y., Thompson, L.J., Höhfeld, J., and Patterson, C. (2001). The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nat Cell Biol* **3**, 93–96.

Dai, Q., Zhang, C., Wu, Y., McDonough, H., Whaley, R.A., Godfrey, V., Li, H.H., Madamanchi, N., Xu, W., Neckers, L., Cyr, D., and Patterson, C. (2003). CHIP activates HSF1 and confers protection against apoptosis and cellular stress. *EMBO J* **22** (20), 5446-5458.

Dammer, E.B., Na, C.H., Xu, P., Seyfried, N.T., Duong, D.M., Cheng, D., Gearing, M., Rees, H., Lah, J.J., Levey, A.I., et al. (2011). Polyubiquitin linkage profiles in three models of proteolytic stress suggest the etiology of Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* **286**, 10457–10465.

Daugaard, M., Rohde, M., and Jäättelä, M. (2007). The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Letters* **581**, 3702–3710.

DeLuca-Flaherty, C. McKay, D.B., Parham, P., Hill, B.L. (1990). Uncoating protein (hsc70) binds a conformationally labile domain of clathrin light chain LCa to stimulate ATP hydrolysis. *Cell* **62** (5), 875-887

Demand, J., Alberti, S., Patterson, C., and Höhfeld, J. (2001). Cooperation of a ubiquitin domain protein and an E3 ubiquitin ligase during chaperone/proteasome coupling. *Curr Biol* **11**, 1569-1577.

Dice, J.F. (2007). Chaperone-mediated autophagy. *Autophagy* **3**, 295–299.

Dickey, C.A., Kamal, A., Lundgren, K., Klosak, N., Bailey, R.M., Dunmore, J., Ash, P., Shoraka, S., Zlatkovic, J., Eckman, C.B., et al. (2007). The high-affinity HSP90-CHIP complex recognizes and selectively degrades phosphorylated tau client proteins. *Journal of Clinical Investigation* **117**, 648–658.

Dickey, C.A., Koren, J., Zhang, Y.J., Xu, Y.F., Jinwal, U.K., Birnbaum, M.J., Monks, B., Sun, M., Cheng, J.Q., Patterson, C., et al. (2008). Akt and CHIP coregulate tau degradation through coordinated interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 3622-3627.

Dickey, C.A., Yue, M., Lin, W.L., Dickson, D.W., Dunmore, J.H., Lee, W.C., Zehr, C., West, G., Cao, S., Clark, A.M., Caldwell, G.A., Caldwell, K.A., Eckman, C., Patterson, C., Hutton, M., and Petrucelli, L. (2006). Deletion of the ubiquitin ligase CHIP leads to the accumulation, but not the aggregation, of both endogenous phospho- and caspase-3-cleaved tau species. *J Neurosci* **26** (26), 6985-6996.

Dikshit, P., and Jana, N.R. (2007). The co-chaperone CHIP is induced in various stresses and confers protection to cells. *Biochem Biophys Res Commun* **357** (3), 761-765.

Dillin, A., Crawford, D.K., and Kenyon, C. (2002). Timing requirements for insulin/IGF-1 signaling in *C. elegans*. *Science* **298** (5594), 830-834.

Esser, C., Scheffner, M., and Höhfeld, J. (2005). The chaperone-associated ubiquitin ligase CHIP is able to target p53 for proteasomal degradation. *J Biol Chem* **280**, 27443–27448.

Finkel, T., and Holbrook, N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408** (6809), 239-247.

Finley D, Ciechanover A., and Varshavsky A. (2004). Ubiquitin as a central cellular regulator. *Cell* **116** (2 Suppl), S29-32, 2 p following S32.

Fotin, A., Cheng, Y., Grigorieff, N., Walz, T., Harrison, S.C., Kirchhausen, T. (2004). Structure of an auxilin-bound clathrin coat and its implications for the mechanism of uncoating. *Nature* **432** (7017), 649-653.

Fourie, A.M., Sambrook, J.F., and Gething, M.J. (1994). Common and divergent peptide binding specificities of hsp70 molecular chaperones. *J Biol Chem* **269** (48), 30470-30477.

Frydman, J., and Höhfeld, J. (1997). Chaperones get in touch: the Hip-Hop connection. *Trends Biochem Sci* **22**, 87-92.

Gardai, S.J., Hildeman, D.A., Frankel, S.K., Whitlock, B.B., Frasch, S.C., Borregaard, N., Marrack, P., Bratton, D.L., and Henson, P.M. (2004). Phosphorylation of Bax Ser184 by Akt regulates its activity and apoptosis in neutrophils. *J Biol Chem* **279** (20), 21085-21095.

Garigan, D., Hsu, A.L., Fraser, A.G., Kamath, R.S., Ahringer, J., and Kenyon, C. (2002). Genetic analysis of tissue aging in *Caenorhabditis elegans*: a role for heat-shock factor and bacterial proliferation. *Genetics* **161** (3), 1101-1012.

Gavin, J.R. 3rd, Roth, J., Neville, D.M. Jr, de Meyts, P., and Buell, D.N. (1974). Insulin-dependent regulation of insulin receptor concentrations: a direct demonstration in cell culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71** (4), 84-88.

Gems, D., and Partridge, L. (2001). Insulin/ IGF signaling and ageing: seeing the bigger picture. *Curr Opin Genet Dev* **11** (3), 287-292.

Georg Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer F., Su, K.C., Barinova Y., Fellner M., Gasser B., Kinsey K., Oppel S., Scheiblaue S., Couto A., Marra V., Keleman K., and Dickson, B.J. (2007). A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature* **448** (7150), 151-156.

Giannakou, M.E., Partridge, L., 2007. Role of insulin-like signalling in *Drosophila* lifespan. *Trends Biochem Sci* **32**, 180-188.

Gottlieb, S., and Ruvkun, G. (1994). Daf-2, daf-16 and daf-23: genetically interacting genes controlling Dauer formation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **137** (1), 107-120.

Green, A., and Olefsky, J.M. (1982). Evidence for insulin-induced internalization and degradation of insulin receptors in rat adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79** (2), 427-431.

Greer, E.L., and Brunet, A. (2005). FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* **24** (50), 7410-7425.

Grönke, S., Clarke, D.F., Broughton, S., Andrews, T.D., and Partridge, L. (2010). Molecular evolution and functional characterization of *Drosophila* insulin-like peptides. PLoS Genet **6** (2): e1000857

Guarente, L., and Kenyon, C. (2000). Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. Nature **408** (6809), 255-262.

Haglund, K., Sigismund, S., Polo, S., Szymkiewicz, I., Di Fiore, P.P., and Dikic, I. (2003). Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. Nat Cell Biol **5** (5), 461-466.

Hartmann-Petersen R., Seeger M. and Gordon C. (2003). Transferring substrates to the 26S proteasome. Trends Biochem Sci **28**, 26-31.

Hatakeyama, S., Yada, M., Matsumoto, M., Ishida, N. & Nakayama, K.-I. (2001). U-Box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. J Biol Chem **276**, 33111-33120.

Hay, N., and Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. Genes Dev **18** (16), 1926-1945.

Hicke, L., and Dunn, R. (2003). Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. Annu Rev Cell Dev Biol **19**, 141-172.

Hill, T.A., Gordon, C.P., McGeachie, A.B., Venn-Brown, B., Odell, L.R., Chau, N., Quan, A., Mariana, A., Sakoff, J.A., Chircop, M., Robinson, P.J., and McCluskey, A. (2009). Inhibition of dynamin mediated endocytosis by the dynoles--synthesis and functional activity of a family of indoles. J Med Chem **52** (12), 3762-3772.

Höhfeld, J., Cyr, D.M., and Patterson, C. (2001). From the cradle to the grave: molecular chaperones that may choose between folding and degradation. *EMBO Rep* **2**, 885–890.

Holzenberger, M., Dupont, J., Ducos, B., Leneuve, P., Gélöën, A., Even, P.C., Cervera, P., and Le Bouc, Y. (2002). IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* **421** (6919), 182-187.

Hsu, A.L., Murphy, C.T., and Kenyon, C. (2003). Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science* **300** (5622), 1142-1145.

Hubbard, S.R., Wei, L., Ellis, L., and Hendrickson, W.A. (1994). Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. *Nature* **372** (6508), 746-754.

Jackson P.K., Eldridge A.G., Freed E., Furstenthal L., Hsu J.Y., Kaiser B.K. & Reimann J.D. (2000). The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol* **10**, 429-439.

Jeney, V., Itoh, S., Wendt, M., Gradek, Q., Ushio-Fukai, M., Harrison, D.G., and Fukai, T. (2005). Role of antioxidant-1 in extracellular superoxide dismutase function and expression. *Circ Res* **96** (7), 723-729.

Jiang, J., Ballinger, C.A., Wu, Y., Dai, Q., Cyr, D.M., Höhfeld, J., and Patterson, C. (2001). CHIP is a U-box-dependent E3 ubiquitin ligase: identification of Hsc70 as a target for ubiquitylation. *J Biol Chem* **276** (46), 42938-42944.

Jiang, H., and Edgar, B.A. (2011). Intestinal stem cells in the adult *Drosophila* midgut. *Exp Cell Res* **317** (19), 2780-2788.

Joazeiro C.A. & Weissman A.M. (2000). RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* **102** (5), 549-552.

Johnson, T.E. (1990). Increased life-span of age-1 mutants in *Caenorhabditis elegans* and lower Gompertz rate of aging. *Science* **249** (4971), 908-912.

Jünger, M.A., Rintelen, F., Stocker, H., Wasserman, J.D., Végh, M., Radimerski, T., Greenberg, M.E., and Hafen, E. (2003). The *Drosophila* forkhead transcription factor FOXO mediates the reduction in cell number associated with reduced insulin signaling. *J Biol* **2** (3), 20.

Kaletsky, R., and Murphy, C.T. (2010). The role of insulin/IGF-like signaling in *C. elegans* longevity and aging. *Dis Model Mech* **3** (7-8), 415-419.

Kenyon, C. (2005). The plasticity of aging: insights from long-lived mutants. *Cell* **120** (4), 449-460.

Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A., and Tabtiang, R. (1993). A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* **366** (6454), 461-464.

Kimura, K.D., Tissenbaum, H.A., Liu, Y., and Ruvkun, G. (1997). *Daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **277** (5328), 942-946

Kirkwood, T.B. (1977). Evolution of ageing. *Nature* **270**, 301-304.

Kirkwood, T.B., and Austad, S.N. (2000). Why do we age? *Nature* **408**, 233-238.

Klionsky, D. J. *et al.* (2008). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* **4** (2), 151–175.

Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker S., Ulrich H.D., Mayer, T.U., and Jentsch, S. (1999). A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* **96**, 635-44.

Kops,G.J., Dansen, T.B., Polderman, P.E., Saarloos, I., Wirtz, K.W., Coffey, P.J., Huang, T.T., Bos, J.L., Medema, R.H., and Burgering, B.H. (2002). *Nature* **419** (6904), 316-321.

Kravtsova-Ivantsiv, Y., and Ciechanover, A. (2012). Non-canonical ubiquitin-based signals for proteasomal degradation. *Journal of Cell Science* **125**, 539–548.

Kusari, J., Takata, Y., Hatada, E., Freidenberg, G., Kolterman, O., and Olefsky, J.M. (1991). Insulin resistance and diabetes due to different mutations in the tyrosine kinase domain of both insulin receptor gene alleles. *J Biol Chem* **266** (8), 5260-5267.

Landis, G.N., and Tower, J. (2005). Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mech Ageing Dev* **126** (3), 365-379.

Laufen, T., Mayer, M.P., Beisel, C., Klostermeier, D., Mogk, A., Reinstein, J., and Bukau, B. (1999). Mechanism of regulation of Hsp70 chaperones by DnaJ cochaperones. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 5452–5457.

Lazareva, A.A., Roman, G., Mattox, W., Hardin, P.E., and Dauwalder, B. (2007). A role for the adult fat body in *Drosophila* male courtship behavior. *PLoS Genet* **3** (1), e16

Lin, K., Dorman, J.B., Rodan, A., and Kenyon, C. (1997). Daf-16: An HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans*. *Science* **278** (5341), 1319-1322.

- Lin, K., Hsin, H., Libina, N., and Kenyon, C. (2001). Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling. *Nat Genet* **28** (2),139-145.
- Mair, W., and Dillin, A. (2008). Aging and survival: the genetics of life span extension by dietary restriction. *Annu Rev Biochem* **77**, 727-754.
- Mayer, M.P., and Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* **62**, 670–684.
- McMahon, H.T., und Boucrot, E. (2011). Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12** (8), 517-533.
- Meacham, G.C., Patterson, C., Zhang, W., Younger, J.M., and Cyr, D.M. (2001). The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nat Cell Biol* **3**, 100–105.
- Miller, V.M., Nelson, R.F., Gouvion, C.M., Williams, A., Rodriguez-Lebron, E., Harper, S.Q., Davidson, B.L., Rebagliati, M.R., and Paulson, H.L. (2005). CHIP suppresses polyglutamine aggregation and toxicity in vitro and in vivo. *J Neurosci* **25** (40), 9152-9161.
- Min, J.N., Whaley, R.A., Sharpless, N.E., Lockyer, P., Portbury, A.L., and Patterson, C. (2008). CHIP deficiency decreases longevity, with accelerated aging phenotypes accompanied by altered protein quality control. *Mol Cell Biol* **28** (12), 4018-4025.
- Miron, M., Lasko, P., and Sonenberg, N., (2003). Signaling from Akt to FRAP/TOR targets both 4E-BP and S6K in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* **23**, 9117-9126.
- Mizushima, N., and Yoshimori, T. (2007). How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* **3** (6), 542-545.
- Moller, D.E., Yokota, A., Ginsberg-Fellner, F., and Flier, J.S. (1990). Functional properties of a naturally occurring TRP1200----Ser1200 mutation of the insulin receptor. *Mol Endocrinol* **4** (8), 1183-1191.

Morley, J.F., and Morimoto, R.I. (2004). Regulation of longevity in *Caenorhabditis elegans* by heat shock factor and molecular chaperones. *Mol Biol Cell* **15** (2), 657-664.

Murata S., Minami Y., Minami M., Chiba T., and Tanaka, K. (2001). CHIP is a chaperonedependent E3 ligase that ubiquitylates unfolded protein. *EMBO Rep* **2**, 1133-1138.

Murphy, C.T. (2006). The search for DAF-16/FOXO transcriptional targets: approaches and discoveries. *Exp Gerontol* **41** (10), 910-921.

Nässel, D.R., Kubrak, O.I., Liu, J., Luo, J., and Lushchak, O.V. (2013). Factors that regulate insulin producing cells and their output in *Drosophila*. *Front Physiol* ;4:252. doi: 10.3389.

Nandi, D., Tahiliani, P., Kumar, A., and Chandu, D. (2006). The ubiquitin-proteasome system. *J Biosci* **31**, 137–155.

Nikolay, R., Wiederkehr, T., Rist, W., Kramer, G., Mayer, M.P., and Bukau, B. (2004). Dimerization of the human E3 ligase, CHIP, via a coiled-coil domain is essential for its activity. *J Biol Chem* **4**, 2673-2678.

Nyström, T. (2005). Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J* **24** (7), 1311-1317.

O'Brien, L.E., Soliman, S.S., Li, X., and Bilder, D. (2011). Altered modes of stem cell division drive adaptive intestinal growth. *Cell* **147** (3), 603-614.

Ogg, S., Paradis, S., Gottlieb, S., Patterson, G.I., Lee, L., Tissenbaum, H.A., and Ruvkun, G. (1997). The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature* **389** (6654), 994-999.

Ohlstein, B., and Spradling, A. (2006). The adult *Drosophila* posterior midgut is maintained by pluripotent stem cells. *Nature* **439** (7075), 470-474.

Okabayashi, Y., Maddux, B.A., McDonald, A.R., Logsdon, C.D., Williams, J.A., and Goldfine, I.D. (1989). Mechanisms of insulin-induced insulin receptor downregulation. Decrease of receptor biosynthesis and mRNA levels. *Diabetes* **38** (2), 182-187.

Okiyoneda, T., Barrière H., Bagdány, M., Rabeh, W.M., Du, K., Höhfeld, J., Young, J.C., and Lukacs, G.L. (2010). Peripheral protein quality control removes unfolded CFTR from the plasma membrane. *Science* **329** (5993), 994-999.

Oldham, C.E., Mohny, R.P., Miller, S.L., Hanes, R.N., and O'Bryan, J.P. (2002). The ubiquitin-interacting motifs target the endocytic adaptor protein epsin for ubiquitination. *Curr Biol* **12** (13), 1112-1116.

Olofsson, S.O., Andersson, L., Haversen, L., Olsson, C., Myhre, S., Rutberg, M., Mobini, R., Li, L., Lu, E., Boren, J., and Boström, P. (2011). The formation of lipid droplets: possible role in the development of insulin resistance/type 3 diabetes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **85** (5), 215-218.

Osterwalder, T., Yoon, K.S., White, B.H., and Keshishian, H. (2001). A conditional tissue-specific transgene expression system using inducible GAL4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 12596-12601.

Partridge, L. (2011). Some highlights of research on aging with invertebrates. *Aging Cell* **10** (1), 5-9.

Perez, F.P., Moinuddin, S.S., ul ain Shamim, Q., Joseph, D.J., Morisaki, J., and Zhou, X. (2012). Longevity pathways: HSF1 and FoxO pathways, a new therapeutic target to prevent age-related diseases. *Curr Aging Sci* **5** (2), 87-95.

Petrucelli, M., Dickson, D., Kehoe, K., Taylor, J., Snyder, H., Grover, A., De Lucia, M., McGowan, E., Lewis, J., Prihar, G., Kim, J., Dillmann, W.H., Browne, S.E., Hall, A., Voellmy, R., Tsuboi, Y., Dawson, T.M., Wolozin, B., Hardy, J., and Hutton, M. (2004). CHIP and Hsp70 regulate tau ubiquitination, degradation and aggregation. *Hum Mol Genet* **13** (7), 703-714.

- Pickart C.M., and Cohen R.E. (2004). Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 177-87.
- Poirier, L., Shane, A., Zheng, J., and Seroude, L. (2008). Characterization of the *Drosophila* gene-switch system in aging studies: a cautionary tale. *Aging Cell* **7**, 758-770.
- Polo, S., Sigismund, S., Faretta, M., Guidi, M., Capua, M.R., Bossi, G., Chen, H., De Camilli, P., and Di Fiore, P.P. (2002). A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins. *Nature* **416** (6879), 451-455.
- Puig, O., Marr, M. T., Ruhf, M.L., and Tjian, R. (2003). Control of cell number by *Drosophila* FOXO: downstream and feedback regulation of the insulin receptor pathway. *Genes Dev* **17** (16) 2006-2020.
- Radtke, F., and Clevers, H. (2005). Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science* **307** (5717), 1904-1909.
- Rappaport, J.Z. (2008). Focussing on clathrin-mediated endocytosis. *Biochem J.* **412** (3):415-423.
- Reiher, W., Shirras, C., Kahnt, J., Baumeister, S., Isaac, R.E., and Wegener, C. (2011). Peptidomics and peptide hormone processing in the *Drosophila* midgut. *J Proteome Res* **10** (4), 1881-1892.
- Roman, G., Endo, K., Zong, L., Davis, R.L. (2001). P[Switch], a system for spatial and temporal control of gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 12602-12607.
- Rüdiger, S., Buchberger, A., and Bukau, B. (1997). Interaction of Hsp70 chaperones with substrates. *Nat Struct Biol* **4** (5), 342-349.

Russell, D.S., Gherzi, R., Johnson, E.L., Chou, C.K., and Rosen, O.M. (1987). The protein-tyrosine kinase activity of the insulin receptor is necessary for insulin-mediated receptor down-regulation. *J Bio Chem* **262** (24), 11833-11840.

Salih, D.A., and Brunet, A. (2008). FoxO transcription factors in the maintenance of cellular homeostasis during aging. *Curr Opin Cell Biol* **20** (2), 126-136.

Saltiel, A.R., and Kahn, C.R. (2001). Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **414** (6865), 799-806.

Saltiel, A.R., and Pessin, J.E. (2002). Insulin signaling pathways in time and space. *Trends Cell Biol* **12** (2), 65-71.

Samuelson, A.V., Carr, C.E., and Ruvkun, G. (2007). Gene activities that mediate increased life span of *C. elegans* insulin-like signaling mutants. *Genes Dev* **21** (22), 2976-2994.

Santo, E.E., Stroeken, P., Sluis, P.V., Koster, J., Versteeg, R., and Westerhout, E.M. (2013). FOXO3a Is a Major Target of Inactivation by PI3K/AKT Signaling in Aggressive Neuroblastoma. *Cancer Res* **73** (7), 2189-2198.

Sanyal, D. (2013). Diabetes is predominantly an intestinal disease. *Indian J Endocrinol Metab* (Suppl 1):S64-7. doi: 10.4103/2230-8210.119508.

Sarkar, M., Kuret, J., and Lee, G. (2008). Two motifs within the tau microtubule-binding domain mediate its association with the hsc70 molecular chaperone. *J Neurosci Res* **86** (12), 2763-2773.

Sarkar, S., Brautigan, D.L., Parsons, S.J., and Larner, J.M. (2014). Androgen receptor degradation by the E3 ligase CHIP modulates mitotic arrest in prostate cancer cells. *Oncogene* **33**, 26-33.

Satoh, T., Enokido, Y., Aoshima, H., Uchiyama, Y., and Hatanaka, H. (1997). Changes in mitochondrial membrane potential during oxidative stress-induced apoptosis in PC12 cells. *J Neurosci Res* **50** (3), 413-420.

Scheufler C., Brinker A., Bourenkov G., Pegoraro S., Moroder L., Bartunik H., Hartl F.U., and Moarefi I. (2000). Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell* **101**, 199-210.

Selman, C., Lingard, S., Choudhury, A.I., Batterham, R.L., Claret, M., Clements, M., Ramadani, F., Okkenhaug, K., Schuster, E., Blanc, E., Piper, M.D., Al-Qassab, H., Speakman, J.R., Carmignac, D., Robinson, I.C., Thornton, J.M., Gems, D., Partridge, L., and Withers, D.J. (2008). Evidence for lifespan extension and delayed age-related biomarkers in insulin receptor substrate 1 null mice. *FASEB J* **22** (3), 807-818.

Shimura, H., Schwartz, D., Gygi, S.P., and Kosik, K.S. (2004). CHIP-Hsc70 complex ubiquitinates phosphorylated tau and enhances cell survival. *J Biol Chem* **279** (6), 4869-4876.

Shin, Y., Klucken, J., Patterson, C., Hyman, B.T., and McLean, P.J. (2005). The co-chaperone carboxyl terminus of Hsp70-interacting protein (CHIP) mediates alpha-Synuclein degradation decisions between proteasomal and lysosomal pathways. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 23727–23734.

Shomura, Y., Dragovic, Z., Chang, H.-C., Tzvetkov, N., Young, J.C., Brodsky, J.L., Guerriero, V., Hartl, F.U., and Bracher, A. (2005). Regulation of Hsp70 Function by HspBP1. *Molecular Cell* **17**, 367–379.

Slotman, J.A., da Silva Almeida, A.C., Hassink, G.C., van de Ven, R.H., van Kerkhof, P., Kuiken, H.J., and Strous, G.J. (2012). Ubc13 and COOH terminus of Hsp70-interacting protein (CHIP) are required for growth hormone receptor endocytosis. *J Biol Chem* **287**, 15533-15543.

Sondermann, H. (2001). Structure of a Bag/Hsc70 Complex: Convergent Functional Evolution of Hsp70 Nucleotide Exchange Factors. *Science* **291**, 1553–1557.

Song, R., Peng, W., Zhang, Y., Lv, F., Wu, H.K., Guo, J., Cao, Y., Pi, Y., Jin, L., Zhang, M., Jiang, P., Liu, F., Meng, S., Zhang, X., Jiang, P., Cao, C.M., and Xiao, R.P. (2013). Central role of E3 ubiquitin ligase MG53 in insulin resistance and metabolic disorders. *Nature* **494** (7437), 375-379.

Stankowski, J.N., Zeiger, S.L., Cohen, E.L., DeFranco, D.B. Cai, J. and McLaughlin, B. (2011). C-terminus of heat shock cognate 70 interacting protein increases following stroke and impairs survival against acute oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* **14** (10), 1787-1801.

Straus, D.S. (1981). Effects of insulin on cellular growth and proliferation. *Life Sci* **29** (21), 2131-2139.

Su, C.H., Wang, C.Y., Lan, K.H., Li, C.P., Chao, Y., Lin, H.C., Lee, S.D., and Lee, W.P. (2011). Akt phosphorylation at Thr308 and Ser473 is required for CHIP-mediated ubiquitination of the kinase. *Cell Signal* **23** (11), 1824-1830.

Taha, C., and Klip, A. (1999). The insulin signaling pathway. *J Membr Biol* **169** (1), 1-12.

Takei, K., and Haucke, V. (2001). Clathrin-mediated endocytosis: membrane factors pull the trigger. *Trends in Cell Biology* **11** (9), 385-391.

Takenaka, I.M., Leung, S.M., McAndrew, S.J., Brown, J.P., and Hightower, L.E. (1995). Hsc70-binding peptides selected from a phage display peptide library that resemble organellar targeting sequences. *J Biol Chem* **270** (34), 19839-19844.

Tatar, M., Kopelmanm, A., Epstein, D., Tu, M.P., Yin, C.M., and Garofalo, R.S. (2001). A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function. *Science* **292** (5514), 107-110.

Taylor, J.P., Hardy, J., and Fischbeck, K.H. (2002). Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science* **296**, 1991–1995.

- Teleman, A.A., (2010). Molecular mechanisms of metabolic regulation by insulin in *Drosophila*. *Biochem J* **425**, 13-26.
- Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., and Pickart, C.M. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J.* **19**, 94–102.
- Timsit, Y.E., Miller, S. L., Mohny, R.P., and O'Bryan, J.P. (2005). The U-box ligase carboxyl-terminus of Hsc 70-interacting protein ubiquitylates Epsin. *Biochem Biophys Res Commun.* **328** (2), 550-559.
- Tonkiss, J., and Calderwood, S.K. (2005). Regulation of heat shock gene transcription in neuronal cells. *Int J Hyperthermia* **21** (5), 433-444.
- Tsuruta, F., Masuyama, N., and Gotoh, Y. (2002). The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt pathway suppresses Bax translocation to mitochondria. *J Biol Chem* **277** (16), 14040-14047.
- Ungewickell, E., Ungewickell, H., Holstein, S.E., Lindner, R., Prasad, K., Barouch, W., Martin, B., Greene, L.E., and Eisenberg, E. (1995). Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles. *Nature* **378** (6557):632-635.
- Van der Vos, K.E., and Coffey, P.J. (2011). The extending network of FOXO transcriptional target genes. *Antioxid Redox Signal* **14** (4), 579-592.
- Varshavsky A. (2005). Regulated protein degradation. *Trends Biochem Sci* **30**, 283-286.
- Vayssier-Taussat, M., Kreps, S.E., Adrie, C., Dall-Ava, J., Christiani, D., and Polla, B.S. (2002). *Environ Health Perspect* **110** (3), 301-305.
- Veenstra, J.A., Agricola, H.J., and Sellami, A. (2008). Regulatory peptides in fruit fly midgut. *Cell Tissue Res* **334** (3), 499-516.
- Vereshchagina, N., and Wilson, C. (2006). Cytoplasmic activated protein kinase Akt regulates lipid-droplet accumulation in *Drosophila* nurse cells. *Development* **133** (23), 4731-4735.

Vijg, J., and Campisi, J. (2008). Puzzles, promises and a cure for ageing. *Nature* **454**, 1065-1071.

Voges, D., Zwickl, P., and Baumeister, W. (1999). The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* **68**, 1015-1068.

Westhoff B., Chapple J.P., van der Spuy J. J., and Cheetham M.E. (2005). HSP70 is a neuronal shuttling factor for the sorting of chaperone clients to the proteasome. *Curr Biol* **15**, 1058-1064.

Xu, W., Marcu, M., Yuan, X., Mimnaugh, E., Patterson, C., and Neckers, L. (2002). Chaperone-dependent E3 ubiquitin ligase CHIP mediates a degradative pathway for c-ErbB2/Neu. *PNAS* **20**, 12847-12852.

Young J.C., Barral J.M., and Hartl F.U. (2003). More than folding: localized functions of cytosolic chaperones. *Trends Biochem Sci* **28**, 541-547.

Zhang, Y.W., and Arnosti, D.N. (2011). Conserved catalytic and C-terminal regulatory domains of the C-terminal binding protein corepressor fine-tune the transcriptional response in development. *Mol Cell Biol* **31**, 375-384.

Zhang, Y.J., Xu, Y.F., Liu, X.H., Li, D., Yin, J., Liu, Y.H., Chen, X.Q., and Wang, J.Z. (2008). Carboxyl terminus of heat-shock cognate 70-interacting protein degrades tau regardless its phosphorylation status without affecting the spatial memory of the rats. *J Neural Transm* **115** (3), 483-491.

8.2 Internetverweise

Drosophila Genomics Resource Center :

<http://dgrc.cgb.indiana.edu/>

ExPASy Proteomics Server

<http://www.expasy.org/>

FlyBase *Drosophila* Datenbank :

<http://www.flybase.net/>

Pubmed Datenbank :

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>

Webcutter Restriktionsschnittstellen :

<http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>

8.3 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	Mikro
A	Ampere
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
Bp	Basenpaare
c	Konzentration
cm	Zentimeter
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethlendiamin-N, N, N', N'-Tetraacetat
et al.	et aliter
g	Gramm
g	Gravitationskonstante (9,81 m/s)
h	Stunde (hour)
KBE	Koloniebildende Einheit
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
M	Molar (mol/l)
m	Milli
min	Minute
mRNA	Boten-RNA
n	Nano
ODx	Optische Dichte bei X nm
p	Pico
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	Negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffkonzentration
PMSF	Phenyl-methyl-sulfonyl-fluorid
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek	Sekunde
SSC	Natriumchlorid-Natriumziträt
TAE	Tris-Azetat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylendiamin
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
tRNS	Transfer-RNS
U	Units
ü.N.	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine weiteren als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Bonn, 21 Oktober 2015

Riga Tawo